I MICROPARASSITI

I MICROPARASSITI

NELLE MALATTIE DA INFEZIONE

MANUALE TECNICO

DEL DOTTORE

GUIDO BORDONI-UFFREDUZZI, 1853-

---

2 Tavole e parecchie incisioni nel testo.

ROMA TORINO FIRENZE
FRATELLI BOCCA, LIBRAI DI S. M.
—
1885

INDICE

I. Cenni generali sulla morfologia e sulla biologia dei microrganismi.

A. Proprietà morfologiche.

B. Proprietà fisio-patogeniche.

II. Strumenti necessari per le ricerche e loro disinfezione.

III. Sostanze coloranti e metodi di colorazione.

Metodi generali di colorazione semplice.

Metodi generali di colorazione doppia.

Metodi di colorazione speciali.

IV. Ricerca dei microparassiti nell'organismo animale (liquidi e tessuti).

V. Ricerche nell'aria, nell'acqua e nel terreno.

VI. Sostanze di nutrizione e metodi di cultura.

VII. Trasmissibilità dei microrganismi patogeni — Innesti — Autopsie.

VIII. Descrizione biologica dei principali microrganismi patogeni.

PREFAZIONE

I progressi rapidi, quasi impreveduti ed insperati, fatti in questi ultimi anni nello studio delle malattie d'infezione, sono dovuti per la più parte all'applicazione di una metodica logica, severa, quasi pedantesca. Di raro concetti teorici così larghi e generali si svolsero da un'osservazione così paziente e minuziosa, da un esperimento tanto curato ne' più minuti particolari, e controllato ad ogni passo da una critica sagace, inesorabile. Di quante indagini, di quanti anni di lavoro questa critica ha dispersi al vento i risultati!

Quanto si è ottenuto finora ha reso più sicura ma non più facile la via. Chi vuol provarsi a risolvere qualcuna delle infinite incognite, che comprende questo capitolo della patologia, o, più modesto, si contenta d'applicare alla pratica medica i risultati già ottenuti da altri, deve sapersi giovare di tutti gli amminicoli, circondarsi di tutte le precauzioni che la scienza insegna ed esige. Il fare altrimenti, il pubblicare, come alcuni fanno, che, mettendo sotto il microscopio del sangue di Tizio, o degli essudati di Caio, hanno trovato dei micrococci o dei bacilli, senza guarentirci intorno al modo con cui venne fatta

l'osservazione, o senza curarsi di porre in sodo l'importanza eziologica dei microrganismi osservati, vuol dire aggiungere nuove scorie a quelle che ingombrano i cosidetti archivi della scienza, e dimostrare di essere stati fermi, mentre la scienza ha progredito a galoppo.

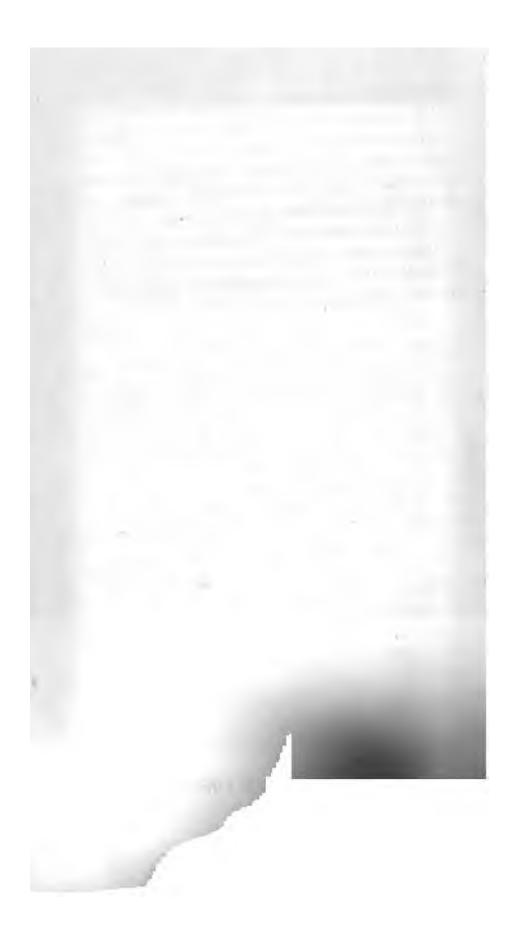
In questo stato di cose mi parve che un libro che raccogliesse e coordinasse tutte quelle nozioni intorno alla metodica della bacteriologia, che si trovano sparse in un gran numero di lavori originali pubblicati in giornali difficilmente accessibili alla generalità degli studiosi, avrebbe dovuto tornare a questi ultimi di grande giovamento. E quando il Dre Bordoni Uffreduzzi mi comunicò la sua intenzione di scrivere un libro su questo argomento, io lo incoraggiai caldamente a farlo.

Il Dre Bordoni Uffreduzzi ha appreso praticamente la bacteriologia nel pregiato laboratorio diretto a Monaco da un allievo di Koch, il Dre Frobenius, e vi ha posto in applicazione le nozioni apprese, compiendovi un lavoro originale sulla pioemia dei vitelli neonati. Tornato in Italia, io gli diedi mezzi nel mio laboratorio di continuare i suoi studi; ed egli se ne giovò sia per attendere ad altri lavori originali, che verranno presto resi di pubblica ragione, sia per controllare i risultati altrui prima di accoglierli nel presente libro.

L'opera adunque che il Dre Bordoni Uffreduzzi offre al pubblico non è una semplice compilazione. Concepita ed elaborata nell'esercizio pratico del laboratorio, essa tien conto di tutti i bisogni di chi s'inizia allo studio della bacterologia, lo guida passo passo, gl'insegna quali sieno le difficoltà da superare, i pericoli da sfuggire, gli scopi da raggiungere. — Ai

capitoli risguardanti la metodica egli ha fatto precedere alcuni capitoli sulla biologia e sull'azione patogenica dei microrganismi, terminando colla descrizione biologica dei microparassiti noti finora; in modo che il lettore può trovare nel presente libro non solo come è fatto e come s' adopera lo strumento, ma anche ciò che si può ottenere per mezzo di esso.

Non conosco alcun libro di bacteriologia che presenti riuniti tutti codesti vantaggi. Ho per ciò fede che il libro del Dre Bordoni Uffreduzzi troverà favorevole accoglienza da parte degli studiosi.

G. Bizzozero.

INTRODUZIONE

Lo scopo di questo libro è altrettanto semplice quanto modesto; è quello di riunire e di esporre in forma chiara e precisa quanto v'ha finora di acquisito in iscienza, relativo ai metodi nuovi di indagine per lo studio dell'eziologia delle malattie da infezione.

Fatto edotto, anche per un po' di pratica acquistata di tali studi in Germania, delle difficoltà che s'incontrano nella esatta applicazione degli stessi, se non si ha a lato una guida pratica e sicura, ho cercato di fornire con questo mio scritto a chi è nuovo, o poco esperto di siffatte discipline, il modo di porsi in grado in breve tempo di conoscerle ed applicarle.

Un tale argomento, oltre il grande interesse scientifico, ha pure acquistato oggidì un'importanza molto notevole dal punto di vista della pratica e dell'igiene. È difatti in virtù di questi studi che il quesito vitale dei disinfettanti ha acquistato oggimai un fondamento serio, avviandosi verso la sua soluzione; ed è sulla cognizione dei metodi odierni che si fonda il criterio diagnostico e prognostico di certe malattie, che dovrebbe anche

servire di norma per la terapia delle stesse; basti citare per tutte l'esempio della tubercolosi e del colèra. L'igienista inoltre se ne avvale con grande vantaggio per l'esame delle acque, dell'aria e del terreno.

In Germania difatti, dove è giustamente apprezzato l'altissimo valore delle questioni d'igiene, e l'avvenire che è serbato a questo ramo delle mediche discipline, avvi già un insegnamento officiale, diretto dal Koch, a cui accorrono i medici per mettersi in grado di stabilire con questi metodi, fino dai primi casi di malattia, la diagnosi del colèra (*Choleracursus*). Da noi pertanto, ove finora non è dato attingere da altra fonte che da quella della iniziativa ed energia individuale, ho creduto che un'esposizione dettagliata e chiara, per quanto è possibile, di tale argomento possa servire a supplire, almeno in parte, al difetto d'un insegnamento speciale. — Attalchè il presente libro mira anche a divulgare fra i medici la conoscenza di tali metodi e l'applicazione esatta degli stessi.

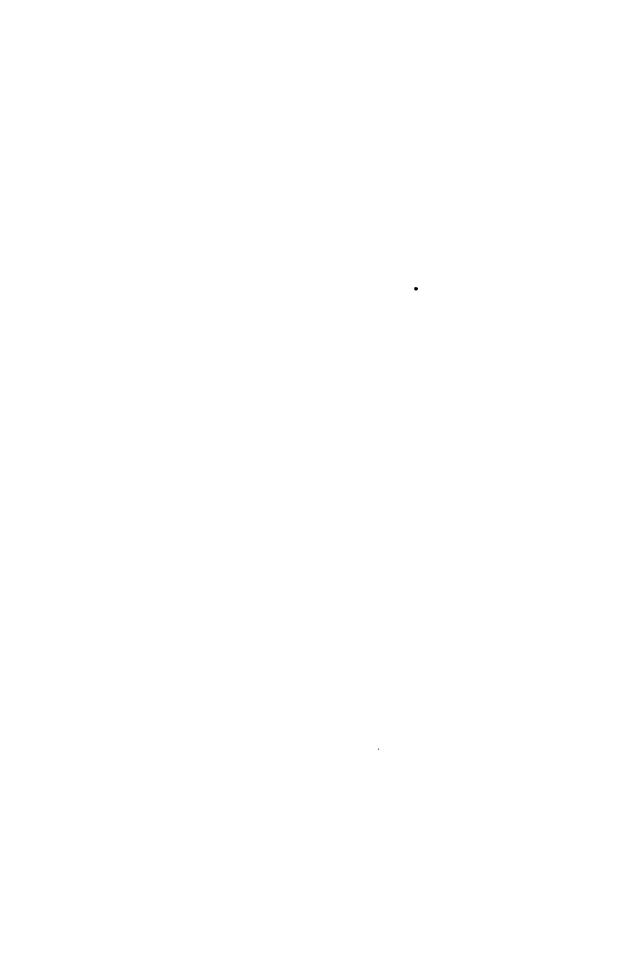
Questo valga ad impedire che taluni, molto scettici e poco pazienti, disprezzino e cerchino di gettare il discredito su fatti e su questioni che non conoscono abbastanza, e ch'altri invece, gettandosi impazienti alla ricerca di fatti nuovi, prima ancora di possederne i mezzi necessari, attribuiscano il loro insuccesso all'imperfezione del metodo, anzichè alla propria insufficienza.

Basti poi lo accennare che le fonti precipue da cui ho attinto sono specialmente gli scritti di Cohn, Pasteur, Nägeli, Zopf, Flügge, ecc.; la sorgente principale però è rappresentata dai lavori del Koch, i cui metodi segnano un progresso incontestabile su tutti gli altri precedenti.

Le figure dei microparassiti sono per la m
segnate dai miei preparati, e le altre ripr

Piacemi infine rendere grazie pubblicamente a quanti mi hanno gentilmente coadiuvato nel compiere quest' assunto, ma innanzi tutto di esternare i sensi della mia profonda gratitudine al Prof. Bizzozero, il quale, come sempre, anche in quest'occasione mi fu largo del suo appoggio e dei suoi autorevolissimi consigli.

Laboratorio di Patologia generale. Torino, Giugno 1885.

L'AUTORE.

CAPITOLO I.

Cenni generali sulla morfologia e sulla biologia dei microrganismi.

Credo utile far precedere anzitutto una breve esposizione delle proprietà biologiche principali finora conosciute di quella classe di funghi microscopici, a cui appartengono le varietà che sono state oramai riconosciute atte a produrre alcune, e forse tutte le malattie da infezione.

Li ho chiamati *funghi microscopici* (*Pilze* di Nägeli), giacchè fin dal 1853 il Cohn (1) ha positivamente stabilito la loro natura vegetale, per quanto però a rigor di termine non sia possibile una delimitazione precisa di un tal gruppo di esseri viventi, di cui alcune specie hanno grandissima rassomiglianza con organismi del regno vegetale (*alghe*), ed altre invece rassomigliano ad organismi animali (*monadi*). Sicchè più propriamente ancora gli esseri in questione sono da riporsi in quel terzo regno della natura, chiamato da Haeckel regno dei *Protisti*, che sta quasi come ponte di passaggio fra quello animale e quello vegetale.

---

(1) Cohn, Nov. Act. Acad. Leop. Carol., 1853.

Il De-Bary (1) fa osservare che neppure la denominazione di funghi, data al gruppo che comprende i microrganismi patogeni, è esatta, poichè in questo sono compresi non solo i tallofiti privi di clorofilla, ma anche altre forme il cui protoplasma cellulare è provvisto di questa sostanza. Tali sono, ad esempio, le due forme trovate nell'acqua dal Van Tieghem (2), e da questi descritte sotto il nome di « bacillus virens » e « bacterium viride », nonchè un'altra specie consimile descritta da Engelmann (3) col nome di « bacterium chlorinum ». Queste però non sono che rare eccezioni, e la maggior parte delle specie sono prive di clorofilla e rientrano per ciò nella classe dei così detti *Pilze* di Nägeli.

Nomenclatura.

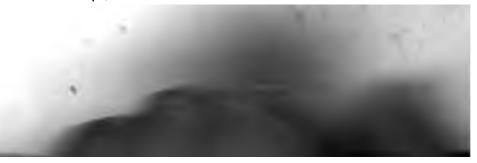
Una prima cosa su cui converrebbe mettersi d'accordo è la loro nomenclatura. Ed invero chi per la prima volta si fa a leggere gli scritti molteplici che trattano dell'argomento, deve certamente trovarsi in non piccolo imbarazzo, incontrando nomi diversi applicati alla stessa specie di microrganismi.

Difatti lo Ehremberg (4), che li ha osservati per primo, li ha classificati fra gli infusorii chiamandoli *vibrionidi*, distinguendo le quattro specie di *bacterium*, *vibrio*, *spirillum* e *spirochaete*. Il Pasteur li designa col nome di *funghi* e di *infusorii*, distinguendoli in *torulacee*, *batteri*, *vibrioni*, *monadi* ecc. Il Béchamp ha proposto di chiamarli *microzimi*; il Davaine

(1) De Bary, *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze*, II Aufl., Leipzig 1884.

(2) Van Tieghem, *Sur quelques Bactéries vertes* etc. Bulletin Soc. bot. de France t. [illegible], 1880, p. [illegible]

(3) Engelmann, *Zur Biologie der Schizomyceten*, Botanische Zeitung, 1882.

(4) Ehrenberg, *Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen*, Leipzig 1838.

bacteridii; il Klebs li divide in *microsporine* e *monadine;* il Sedillot ha per primo proposto il nome generico di *microbi,* il Nägeli li chiama *schistomiceti* (*o Spaltpilze*), nome che indica la loro proprietà di riprodursi per scissione, e finalmente il Cohn ed il Koch li raccolgono tutti sotto il nome collettivo di *batteri.*

In mezzo a tanta confusione di nomi può riuscire talora difficile il raccapezzarsi, e la necessità di un' unica nomenclatura si fa sentire ogni giorno di più. Questo però dipende in gran parte dalla classificazione degli stessi, ed un accordo su questa nello stato attuale della scienza non appare ancora possibile; cosicchè, essendo la questione tuttora *sub judice,* nel presente lavoro mi varrò delle espressioni generali, equivalenti di *microparassiti* o *microrganismi patogeni,* o semplicemente *microbi,* avvertendo, una volta per sempre, che questi rientrano per la maggior parte nei cosidetti « Spaltpilze » di Nägeli, o nei « batteri » del Koch e del Cohn. In tal modo non si pregiudica affatto la questione per l'avvenire, mentre invece, designando questi esseri col nome di *batteri* e con quello di *batteriologia* il ramo di scienza che se ne occupa, come vedo proposto dalla maggior parte degli autori, si è in errore; sia perchè oltre i così detti batteri esistono anche altre specie di microrganismi che sono produttori di malattia, come pure perchè altri potrebbero esserlo che non si conoscono ancora.

Classificazione.

Altrettanta confusione ed incertezza regna eziandio sulla loro classificazione; e ciò deriva dal non essere ancora ben conosciute le condizioni di vita di questi esseri inferiori, relative al loro modo di nutrirsi, di crescere e di riprodursi; poichè su questo soltanto deve esser basata, secondo i dettami della scienza, una divisione sistematica e razionale.

Una prima questione d'indole generale tiene intanto diviso

il campo in due scuole, fra loro assolutamente opposte. Il Cohn, il Koch e la sua scuola ammettono la costanza morfologica dei varii microrganismi patogeni, e ritengono che la forma di cocco, di bacillo, di spirillo, e così via, sieno altrettante specie distinte, le quali rimangono tali tanto nell'organismo animale che li alberga come parassiti, come al di fuori di quello, nelle più svariate condizioni di vita e di nutrizione degli stessi.

Invece il Billroth (1), il Nägeli (2), lo Zopf (3), ed il Buchner (4) sostengono che le forme anzidette stiano tutte in rapporto genetico fra di loro, che sieno cioè semplici stadii di sviluppo di una sola specie, o tutt'al più di un numero di specie assai ristretto. Secondo l'opinione di questi autori, da un unico stipite si potrebbero ottenere tutte le forme di microrganismi che si conoscono (spirilli, spiroceti, bacilli, vibrioni, micrococchi, ecc.), variando semplicemente le condizioni di nutrizione (temperatura e composizione del substrato materiale); e si potrebbe egualmente una forma di micrococco cambiare, ad es., in un bacillo o in uno spirillo, e viceversa, cambiando soltanto il terreno su cui si sviluppa.

Corrispondentemente a siffatto *polimorfismo* dei microbi, si ammette dagli autori succitati anche una modificazione delle loro proprietà fisiologiche e patogeniche, ed il Wernich giunge persino a sostenere che gli stessi microrganismi che noi alberghiamo normalmente in gran numero nel nostro intestino, i quali nelle condizioni ordinarie sono affatto innocui e sembra

---

(1) Billroth, *Untersuchungen über die Vegetationsformen der Coccobacteria septica*, Berlin, 1874.

(2) Naegeli, *Zur Umwandlung der Spaltpilzformen* in « *Untersuchungen über niedere Pilze, aus dem Pflanzenphysiologischen Institut in München* » 1882, p. 130.

(3) Zopf, *Die Spaltpilze*, II Aufl., Breslau, 1884. È da notare che lo Zopf nell'ultima edizione venuta testè alla luce del suo libro (*Die Spaltpilze*, III Aufl., Breslau, 1885) si ricrede alquanto della sua opinione, ed ammette che alcune specie siano polimorfe ed altre no.

(4) Buchner, *Kritik und Experim. über d. Frage v. d. Constanz d. pathog. Spaltpilze* (in Nägeli's Untersuch. ü. nied. Pilze).

anzi coadiuvino l'azione dei succhi digerenti (1), possano in date circostanze divenire patogeni e produrre le forme tifose; mentre viceversa gli stessi microbi, sviluppandosi fuori dell'organismo, si trasformerebbero di bel nuovo negli ordinari ed innocenti bacilli delle feci. È noto che il Buchner sostiene altrettanto a riguardo del « bacillus subtilis » (Heubacillus) e del bacillo carbonchioso.

Le discrepanze, come si vede, sono molto forti, e la questione è invero gravissima; perchè, se fosse esatto quanto ammettono il Nägeli ed il Wernick, tutti quanti gli studii sulla disinfezione non avrebbero più alcuna importanza pratica, essendo impossibile combattere un contagio, che si può riprodurre ad ogni istante da germi che si trovano sparsi dappertutto in quantità innumerevole, e che è inoltre capace di cangiar natura altrettanto rapidamente per diventare affatto innocente.

Per fortuna però gli studi ultimi del Koch e de' suoi discepoli, eseguiti con metodi di coltivazione di gran lunga migliori e più esatti, fanno sperare prossima la soluzione del problema.

Seppure esiste il polimorfismo, come pare provato dagli studi dello Zopf, del Buchner e di altri, in alcune specie di microfiti, altrettanto certo si è che tutti i microrganismi patogeni conosciuti finora mantengono inalterate le loro proprietà morfologiche e funzionali, tanto nell'organismo animale come nei più svariati mezzi di coltivazione. Può bensì aver luogo una certa variazione nella loro grandezza, secondo le condizioni del mezzo e della nutrizione, come ha pure recentemente dimostrato il dottor Hueppe (2) per quelle specie di microfiti che producono le alterazioni del latte, e come hanno osservato altri in molti casi;

---

(1) Bienstock, *Ueber die Bacterien der Faeces*, Fortschritte der Medicin, I, N. 19, 1882.

(2) Hueppe, *Untersuchungen über die Zersetzungen der Milch durch Mikroorganismen*, Mitth. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. II, p. 368, 1884.

ma ciò accade entro limiti assai ristretti, e rimanendo la specie invariata in tutto il resto.

Le sostanze di nutrizione solide e trasparenti, proposte dal Koch, permettono di giudicare con criteri di certezza quasi assoluta della purezza della coltivazione che si ha fra mano, cosa che non era possibile per lo addietro quando si usavano soltanto sostanze liquide. Se si può adunque essere sicuri della purezza delle culture, e se si vede che, trasportando da uno ad un altro mezzo di nutrizione una data specie *isolata* di microrganismi, questa si riproduce costantemente e per parecchie generazioni consecutive nella stessa forma e cogli stessi caratteri biologici, che manifesta anche quando si fa sviluppare nell'organismo animale, si può anche conchiudere con ragione, come fa il Koch, alla costanza morfologica della stessa, che acquista il diritto per ciò di essere classificata a sè quale specie distinta.

Del resto non è tanto il criterio della forma e della grossezza, quale ci apparisce all'osservazione microscopica, che serve a differenziare le varie specie di microrganismi fra di loro, quanto specialmente l'insieme di certe proprietà (modo di crescere, di svilupparsi e di disporsi in aggruppamenti più o meno caratteristici) che manifestano nelle sostanze di nutrizione solide e trasparenti; e queste non poterono essere studiate e poste in evidenza, se non dopo l'impiego dei mezzi di nutrizione speciali suaccennati.

È un fatto bene accertato che ciascuna forma di microbi vive e si sviluppa in alcuni piuttosto che in altri mezzi di nutrizione, e che il loro sviluppo è subordinato a certe condizioni di temperatura, di umidità ecc. ecc., speciali per ciascuna forma, la quale si comporta pure in modo diverso dalle altre verso gli agenti esteriori fisici e chimici. Colle proprietà fisiologiche vanno d'accordo quelle patogeniche, giacchè una data specie di microrganismi patogeni, anche coltivata in condizioni diverse di nutrizione e riprodotta fuori dell'organismo per molte generazioni consecutive, conserva pur sempre la proprietà di riprodurre negli animali le stesse manifestazioni morbose caratteristiche. È bensì

vero che, variando le condizioni di vita, si può anche produrre una certa variazione nelle loro proprietà fisio-patogeniche, come hanno provato, ad esempio, il Toussaint, il Pasteur ed il Koch per il bacillo carbonchioso; ma questo fatto dimostra soltanto che il potere patogenico di quei microbi può oscillare entro certi limiti, e che in questi, del pari che in tutti gli altri esseri viventi, cambiando le condizioni esterne dell'ambiente in cui vivono, si modificano pure le loro qualità morfologiche e funzionali, in modo da adattarsi alle nuove esigenze dell'ambiente. Quelle variazioni difatti sono soltanto di grado e non di qualità, e non sono mai così rilevanti da far sì che quel microbo, che oggi si manifesta colle proprietà di un fermento o con quelle di un cromogeno, coltivato in condizioni diverse funzioni domani da elemento nosogenico.

Un altro fatto del resto dimostra pure che le proprietà morfologiche dei microrganismi non sono mutevoli e dipendenti dai diversi terreni nutritizi su cui si sviluppano, ma sono invece proprietà fisse, inerenti agli stessi, ereditabili e preesistenti. Questo fatto è stato osservato dal Koch, dal Gaffky e dal Löffler nelle loro ricerche sull'attenuazione del virus carbonchioso (1), ed è che il bacillo del carbonchio, una volta attenuato, non riacquista più la sua primitiva virulenza, neanche se coltivato per anni in sostanze nutritive le più svariate, e neppure quando viene nuovamente inoculato negli animali. Anche fra gli altri microrganismi non patogeni abbiamo esempi molteplici in appoggio del nostro asserto, poichè, ad esempio, quelli che sono i fattori del processo di putrefazione, per quanto si cangino le condizioni del loro sviluppo, non si vedono giammai produrre una qualsiasi specie di fermentazione, ciascuna delle quali anzi deve la sua origine ad un particolare microfito.

---

(1) Kock, Gaffky u. Löffler, *Experimentelle Studien über die künstliche Abschwächung der Milzbrandbacillen und Milzbrandinfection durch Fütterung*, Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Bd. II, p. 147.

Se adunque nello stato presente della scienza non possiamo assolutamente designare col nome di specie, presa la parola nel significato che ha in istoria naturale, i singoli microparassiti, possiamo però affermare in maniera positiva che questi mantengono tenacemente, per lungo tempo e attraverso molte generazioni le loro proprietà specifiche, e che le differenze suaccennate, sia morfologiche che fisiologiche, autorizzano meglio a ritenerli quali specie distinte, piuttosto che stadii di vegetazione di un'unica specie.

Anche recentemente il Flügge (1) ha profondamente criticato la teoria del Nägeli e dello Zopf i quali, ammettendo che quella che il Cohn ritiene quale forma attuale costante degli elementi microfitici non sia che uno stadio di sviluppo degli stessi combattono la classificazione proposta da questo autore, basata semplicemente sui caratteri morfologici.

Il Billroth ha classificato i microbi in due grandi categorie, dei *cocci* e dei *batteri*, le quali deriverebbero dall'unico stipite dei *coccobatteri:* li ha poi distinti, secondo la grandezza, in *micro-*, *meso-* e *mega-cocci*, e in *micro-*, *meso-* e *mega-batteri*, chiamando *monococci* i cocci isolati, *diplococci* quelli riuniti a due a due, e *streptococci* quelli uniti a catena. I *gliococci* sarebbero quelli muniti di capsula mucosa, i *petalococci* o *petalobatteri* quelli muniti di una capsula membranosa. Ho voluto accennare alla classificazione del Billroth, perchè la vedo seguita da alcuni autori anche recentemente.

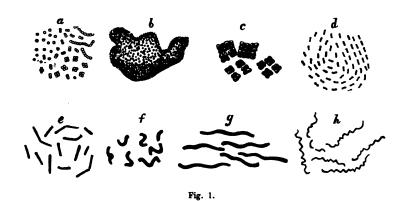
Lo Zopf, basandosi appunto sulla teoria del polimorfismo, ha voluto dare anch'egli una classificazione speciale che non credo necessario di esporre; ed il Klebs ha fatto pure un tentativo di classificazione razionale, basata sui caratteri biologici dei microrganismi patogeni, che egli distingue in *microsporine* e *monadine:* anche questa però è finora troppo primitiva ed incompleta perchè possa avere un qualche valore.

---

(1) Flügge: Deutsche medicinische Wochenschrift, 1884, N. 16.

Il De-Bary si è fondato ugualmente sul modo di svilupparsi dei microbi per distinguerli, come avea già fatto in parte anche prima il Van Tieghem, in due gruppi: *a*) di quelle specie che hanno formazione di spore endogena, *batteri endo-sporiacei*, *b*) delle specie senza sporificazione endogena, *batteri artro-sporiacei*. Egli stesso però confessa di non sapere se tale classificazione sarà durevole o no, aggiungendo che la stessa è poco utile per la pratica.

Concludendo, diremo che, pur ammettendo che quella del Cohn debba essere provvisoria, perchè unilaterale e basata sui soli caratteri di forma, tuttavia fino a che non saranno bene conosciute le proprietà biologiche di questi esseri, per fondarvi sopra una classificazione razionale e sistematica, accettiamo questa ultima come quella che è più semplice e più chiara delle altre, e più rispondente perciò ai bisogni dello studio e della descrizione dei microrganismi.

Fig. 1.

Il Cohn distingue i suoi così detti « batteri » in *sferobatteri*, *microbatteri*, *desmobatteri* e *spirobatteri*.

Gli *sferobatteri* sono costituiti da cellule sferiche od ovali, di 1 a 3 μ di diametro, isolati, o riuniti a catena o per quattro; si dividono in tre generi, *micrococco* (Fig. 1 *a*), *ascococco* e *sarcina* (Fig. 1 *c*).

I *microbatteri* sono costituiti da bastoncini molto corti e comprendono un solo genere, quello semplicemente dei *batteri* (Fig. I *d*), costituiti da cellule cilindriche, mobili, isolati, o riuniti in gruppi di tre o di quattro al più.

I *desmobatteri* sono in forma di bastoncini, oppure di filamenti diritti od ondulati, e comprendono il genere *bacillo* (Fig. 1 *e*), che è l'unico importante dal lato patogenico, il *clostridium* (fusiforme), il *leptotrix* ed il *cladotrix* (pseudobiforcazione).

Finalmente gli *spirobatteri* hanno pure forma di bastoncini, ma sono ricurvi a spirale; e qui se le spire sono corte e sottili, si chiamano *spiroceti* (Fig. 1 *h*), se invece sono allungate e grosse si dicono *spirilli* (Fig. 1 *g*); finalmente taluni designano col nome di *vibrioni* (Fig. 1 *f*) quei bastoncini che sono ondeggianti e ripiegati.

Una divisione netta, assoluta, fra questi varii gruppi non esiste; ed anzi si deve specialmente rammentare che i bastoncini talora sono veri individui cellulari, ed altre volte invece non sono che la riunione di più individui, ad esempio cocciformi, la cui divisione può talora apparire evidente, ma può anche in certi casi lasciare incerto l'osservatore.

Un'altra divisione più generale dei microrganismi, a cui è necessario accennare prima di venire a discorrere delle proprietà di forma e di funzione degli stessi, è quella basata sul modo loro speciale di vivere e sui rapporti che assumono col mondo esterno. La loro caratteristica principale biologica, se non di tutti almeno della maggior parte, è quella di essere sprovvisti di clorofilla, e di non essere in grado perciò di assimilare l'acido carbonico e di fabbricare di per sè il materiale necessario alla costruzione della cellula. Si trovano adunque sempre aderenti alle sostanze organiche preformate, ai composti idrocarbonati ed azotati, i quali vengono scissi dai microrganismi in vario modo, producendo d'ordinario processi di fermentazione o di putrefazione, oppure, se albergano nell'organismo animale vivente, altre modificazioni che sono in gran parte sconosciute. Alcuni di questi microbi vivono e si riproducono a spese degli

organismi già morti, o nelle soluzioni di sostanze organiche, e si dicono *saprofiti;* altri invece albergano nell'organismo vivente, animale o vegetale, e si chiamano *parassiti.* Questi ultimi hanno però la proprietà di vivere e svilupparsi quali *saprofiti* anche fuori dell'organismo, e questo fatto rende possibile lo studio delle loro proprietà biologiche, facendoli sviluppare in appositi terreni di nutrizione.

Rapporto dei microbi coll'organismo normale.

I microparassiti che si sviluppano nell'interno dell'organismo animale dànno luogo nel riprodursi ad alterazioni, or rapide, or lente, che si manifestano appunto sotto forma delle più pericolose malattie da infezione. Ne informi la tubercolosi, il carbonchio, il tifo, la risipola, la febbre ricorrente, il colèra, certe malattie cutanee e degli organi genitali, ecc. La loro importanza patogenica è varia: alcuni ledono appena il tessuto ove risiedono, altri invece producono alterazioni locali notevoli, ma non hanno la facoltà di diffondersi in tutto l'organismo; ed altri finalmente penetrano nel corpo, lo attraversano e possono produrre affezioni multiple degli organi lontani (pioemia).

Le alterazioni locali consistono per lo più nella decomposizione ed infiammazione dei tessuti; l'azione loro generale non si sa ancora bene in che consista, e solo in via di ipotesi molteplice si può ammettere col Nägeli che i microrganismi agiscano ora sottraendo all'organismo le sostanze nutritive, ora togliendo l'ossigeno ai corpuscoli sanguigni ed alterando lo scambio materiale, ed ora finalmente producendo sostanze velenose e fermenti, che decompongono lo zucchero e gli altri composti organici facilmente scindibili.

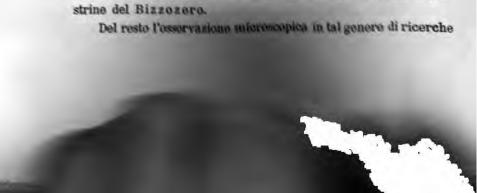
Ma nel nostro corpo, anche normalmente, si trovano numerosi microrganismi, i quali penetrano per mezzo dell'aria e delle vivande nell'apparecchio respiratorio ed in quello digerente; ed infatti parassiti di tal genere innocui, finchè almeno il loro mol-

tiplicarsi non eccede certi limiti, chiamati appunto « parassiti normali », si trovano in gran copia nella mucosa di tutto l'apparecchio digerente e in quella degli organi sessuali, nella patina dentaria, sui peli, nel sudore, e sulla pelle, ove furono recentemente studiati dal Bizzozero nelle loro proprietà morfologiche, e da me a riguardo delle proprietà biologiche principali. In breve si trovano microrganismi numerosi in tutte le parti del corpo che sono esposte all'aria, o che vengono in contatto di materiali introdotti dall'esterno.

Taluni però, e cito fra gli altri il Nägeli, il Nencki e il Giacosa, il Billroth ed il Tiegel, hanno detto di avere osservato microparassiti normali anche nell'interno del nostro organismo, in località prive di qualsiasi comunicazione col mondo esterno: così dicono di averne trovati nel sangue normale, nella milza, nei muscoli, nel fegato, nel pancreas, nei testicoli, nelle ghiandole salivari e persino nel cervello.

Tale questione è per noi importantissima, perchè, se così fosse, nella ricerca della eziologia delle malattie da infezione si resterebbe sempre nel dubbio di avere a che fare con un fatto normale, anche quando nell'interno del corpo si trovassero i più svariati microrganismi. Fortunatamente però a mano a mano che i metodi d'osservazione si fecero più perfetti, e più rigorose furono le cautele usate nel prendere e nel conservare i tessuti soggetti all'esame, una tale opinione è andata sempre più perdendo terreno: e recentemente il Pasteur, il Burdon-Sanderson, il Klebs e lo Zahn con ricerche numerose ed esatte hanno escluso in maniera assoluta l'esistenza dei germi nel sangue normale.

Il Rindfleisch ed il Riess dapprima, eppoi anche il Koch, valendosi dell'aiuto delle sostanze coloranti e dell'apparecchio di illuminazione, riconobbero anche le sorgenti dell'errore degli osservatori precedenti, i quali aveano indubbiamente scambiato con germi di microfiti le granulazioni ordinarie del sangue e le piastrine del Bizzozero.

Del resto l'osservazione microscopica in tal genere di ricerche

non è di per sè sola un criterio sufficiente, ed acquista valore soltanto se è confermata dai risultati delle coltivazioni fatte nei varî mezzi di nutrizione solidi, accuratamente sterilizzati.

Recentissimamente il Dr. Hansen (1) ha eseguito al riguardo una serie di osservazioni accurate, esaminando in 49 animali i visceri freschi, tolti e preparati con le più rigorose cautele antisettiche. Gli organi da lui presi in esame sono stati il rene, la milza, il fegato, i testicoli, i muscoli, ed anche interi embrioni. I pezzi di questi organi posti in tubi di vetro chiusi con ovatta, oppure in piccole scatole di cristallo previamente sterilizzate, furono tenuti per due o tre settimane alla temperatura di 27-30° C., senza che in nessun caso si verificasse la putrefazione. Nel 72,2 % dei casi osservati non si sviluppò alcuna specie di microrganismi, e si verificò soltanto alla fine una alterazione spontanea del tessuto, il quale prese un odore simile a quello dell'estratto di carne. Negli altri casi talora si svilupparono i funghi delle muffe, tal altra saccaromiceti o schistomiceti diversi, dovuti ad impurità provenienti dall'esterno per non avere l'autore osservato scrupolosamente tutte le regole necessarie.

Parimenti il Leube (2) non ha mai trovato nell'orina degli individui normali alcun germe di microrganismi. Cosicchè parmi si possa concludere che, se dopo morte possono dall'apparecchio gastro-enterico penetrare nell'organismo varie specie di microbi che normalmente vi si contengono, durante la vita però tanto il rivestimento epidermoidale esterno, come quello epiteliale interno costituiscono, finchè restano sani, una barriera all'ingresso di quelli nell'interno degli organi e dei tessuti.

---

(1) Hansen, *Ueber das Vorkommen der Mikroorganismen in lebenden Gewebe des normalen thierischen Organismus*, Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften, N. 22, 1884.

(2) Leube, *Zeitschrift für klinische Medicin*, Bd. III.

A) Proprietà morfologiche.

Forma e costituzione dell'individuo cellulare.

La prima comparsa di questi esseri microscopici nel mondo dei viventi non si sa ben precisare a quale epoca appartenga: osservazioni recenti hanno tuttavia dimostrato che è anteriore all'ultimo periodo geologico, e che già nel periodo del carbon fossile esistevano forse gli schistomiceti. Il Van Tieghem, esaminando sezioni sottili delle radici di conifere pietrificate, trovò qua e là nella corteccia e nel tessuto interstiziale dei fasci vascolari alcuni ammassi di uno schistomiceto perfettamente simile al « Clostridium butyricum », essendo anche conservati i varii stadi di sviluppo sotto forma di bacilli, isolati o riuniti in filamenti, e di cellule fusiformi che contenevano le spore.

Lo Zopf (1) ed il Müller hanno poi osservato nell'incrostamento dei denti delle mummie egiziane una forma di fungo simile all'odierno « Leptotrix buccalis » che noi tutti alberghiamo nella nostra bocca.

L'individuo cellulare dei microrganismi, di varia forma come ho disopra esposto, ha una grandezza variabile da 1-10 μ (per lo più 1 μ) e consta di due parti essenziali, la membrana e il contenuto cellulare plasmatico. In alcuni esistono pure organi particolari di movimento, specie di ciglia vibratili, i quali però non sono stati finora positivamente riconosciuti che in poche specie di microbi.

La *membrana* è costituita talora da *cellulosa*, ed altre volte invece da una sostanza albuminoide studiata dal Nencki e da questi chiamata *micoproteina*, che costituisce pure il corpo plasmatico della cellula. Questo fatto è stato osservato dal Nencki nei microbi della putrefazione.

(1) Zopf, Opera citata.

Nel loro più alto grado di sviluppo questi esseri, oltre la membrana compatta, hanno attorno a questa una specie di capsula gelatinosa (*Gallerthülle*); questo fatto ci spiega la tendenza che hanno appunto i varii individui cellulari a riunirsi sotto forma di ammassi, cosidetti *zooglee*.

Il *contenuto cellulare protoplasmatico* è ialino, più refrangente dell' acqua, omogeneo nello stadio di piena vegetazione e contenente in alcune specie, come ad esempio nei « Clodotrix », granuli numerosi di zolfo; è senza nucleo ma spesso con vacuoli di cui si ignora finora il significato. Secondo le ricerche del Nencki sarebbe costituito da micoproteina, sostanza composta da 52,32 % C, 7,55 % H, 14,75 % Az, 25,38 % O, la quale non contiene nè zolfo nè fosforo ed è facilmente solubile negli acidi e negli alcali. Da ricerche più recenti fatte dallo stesso autore sulla composizione dei bacilli carbonchiosi (1) risulterebbe che questi bacilli contengono micoproteina soltanto in piccola quantità, e sono invece per la maggior parte costituiti da un albuminoide simile alla mucina, che egli chiama perciò *micomucina*, solubile negli alcali solamente. In alcune poche specie il protoplasma contiene clorofilla, talora vi esiste pure una sostanza che si crede amiloide perchè si colora in bleu con lo jodio (*Leptotrix buccalis*), per quanto però cotesta reazione non si abbia se non quando la reazione del mezzo sia acida.

Il contenuto plasmatico cellulare è inoltre in alcuni casi provvisto di *pigmento* di vario colore. Il Nägeli però crede che questo colore, che hanno alcuni microrganismi, sia dovuto a materie pigmentarie esistenti nella membrana e non nel corpo della cellula. Il pigmento talora è solubile nell'acqua e si diffonde nel substrato nutritivo; altre volte invece è insolubile e si limita al protoplasma ed alla sostanza intercellulare delle zooglee. Una particolarità degna di nota di questi microrganismi, così detti *cromogeni*, si è che non producono il pigmento in tutti i

---

(1) Nencki, *Chemische Zusammensetzung der Milzbrandbacillen*, Gazeta lekarska, 34/84.

substrati sui quali si sviluppano; così, ad es., il microfito del latte bleu nella glicerina e nelle soluzioni gommose, ove del resto prospera bene, non produce alcuna sostanza colorante.

Gli *organi di movimento* di certi microbi sono costituiti da filamenti sottilissimi ciliari che si manifestano soltanto in determinate condizioni di vita, e sono ora terminali o polari, ed ora invece laterali. L'esistenza di tali organi fu scoperta dall'Ehrenberg e confermata quindi dalle osservazioni di Cohn, Warming, Koch, Brefeld, Prazmowsky, Zopf, ecc., nello « spirillum volutans », nello « spirillum undula », nel « Vibrio regula », in vari bacilli, nel « bacterium termo », nelle « monadi rossi della putrefazione » ed anche nei cocci, e furono dimostrati servendosi dell'aiuto della colorazione e della microfotografia. Cosicchè si può supporre che questi organi esistano in tutte le forme dotate di movimenti proprii, e che soltanto sfuggano sovente all'osservazione per le ragioni esposte qui sotto: per quanto il De Bary (1) si esprima a questo riguardo dicendo che non è ancora accertato che siano veri organi di movimento, non essendo ancora stati veduti in molte specie che sono mobili.

Il numero di queste ciglia varia da 1 a 6 e sono assai difficili a riconoscersi, specialmente nei microbi più minuti, sia per la loro sottigliezza, come pel loro movimento rapido e pel potere di rifrangenza, che è per lo più uguale a quello del substrato liquido che li alberga. Non si sa ancora se questi filamenti provengano dal corpo protoplasmatico e perforino la membrana, come accade per le vere ciglia delle altre cellule vegetali mobili, oppure siano invece un'appendice della membrana stessa, come ritiene il Van Tieghem. Per poter vedere queste ciglia si usa il seguente metodo proposto dal Koch. Si [illegible]

(1) De Bary, [illegible]

zione si trattano i preparati con una soluzione di acido cromico a 0,5 %, oppure colla soluzione di Müller, e si conservano quindi nella glicerina o nel balsamo. Se non si colorano si possono dimostrare col mezzo della fotografia, anche se sono incolori e invisibili pel nostro occhio; giacchè la lastra fotografica è più sensibile per la imagine microscopica che non la nostra retina. Con tutto ciò basta in alcuni casi il semplice disseccamento, o il fissamento coi reagenti chimici, a distruggere questi organi delicatissimi, la ricerca dei quali riesce allora assai difficile.

Oltre il movimento prodotto dagli organi ciliari, i microrganismi posseggono un'altra specie di movimento oscillatorio indipendente dall'esistenza di organi appositi. Tutte e due le sorta di movimento son legate a speciali condizioni del substrato materiale che li nutrisce, rappresentate principalmente dalla temperatura e dalla presenza dell'ossigeno.

La forma di questo movimento è assai varia; talvolta consiste in una rotazione intorno all'asse longitudinale, talaltra invece in un alternativo piegarsi e distendersi dell'individuo cellulare. Alcune forme di microrganismi, come, ad es., i *micrococci*, sono apparentemente sprovvisti di movimenti proprî; altre forme invece, bacilli, batteri e spiroceti, ora appaiono in quiete ed ora in movimento vivace secondo le condizioni suesposte.

Se si osservano al microscopio questi piccoli individui cellulari sospesi in un liquido, si vedono continuamente in preda ad un vivace movimento danzante (movimento molecolare di Brown), che è dovuto all'energia molecolare e che si può facilmente scambiare coi movimenti proprî dei microbi. Talora riesce assai difficile distinguere l'una dall'altra queste due specie di movimenti, ed il criterio più sicuro si ha col variare quelle condizioni esterne, le quali diminuiscono o sopprimono i movimenti autonomi senza avere un' influenza spiccata sul movimento browniano.

I microrganismi o sono liberi, oppure si trovano riuniti sotto forma di colonia. Quando un individuo cellulare si moltiplica per scissione, la cellula figlia per lo più non si distacca totalmente,

ma resta attaccata alla madre per mezzo dell'involucro gelatinoso: cosicchè si formano a poco a poco grossi accumuli di cellule, tenute insieme da una sostanza colloide, e costituiscono ammassi gelatinosi cosidetti *Zooglee* (Fig. 1 b), le quali si osservano più di frequente nei cocci e nei batteri, ma si possono anche incontrare nei bacilli e negli spirocheti.

È abbastanza interessante questa loro proprietà, perchè la figura della zooglea è varia assai e caratteristica per ciascuna specie: serve perciò come un criterio per riconoscere la purezza della cultura e la specie dei microrganismi che si vuol coltivare. Ve ne sono in forma di sfera, di uovo, di filo, di nastro, di grappolo, di arbusto e così via. Quegli ammassi di microrganismi aerobii che si raccolgono sulla superficie dei liquidi di nutrizione, costituendovi una pellicola di differente aspetto e densità, son designati col nome speciale di *micoderma*.

Sviluppo e Riproduzione.

Il moltiplicarsi dei microrganismi succede nella maggior parte dei casi, ma non esclusivamente, per semplice *scissione*, e da ciò appunto deriva il nome di Spaltpilze che han dato a queste specie di microbi i tedeschi.

Questa scissione nelle cellule sferiche (cocci) avviene indifferentemente in qualsiasi direzione: così, a mo' d'esempio, nelle forme di *sarcina* si osserva una contemporanea divisione in quattro direzioni, e ne risulta quella forma caratteristica che ha fatto dare appunto il nome alla specie. Nei bacilli invece la scissione si fa soltanto nel diametro trasversale, cosicchè, quando i singoli individui rimangono uniti fra di loro, costituiscono filamenti più o meno lunghi cosidetti di leptotrix.

A lato però di questa semplice forma vegetativa dei microrganismi, ne esiste pure in certe specie e sotto determinate condizioni un'altra di vera [illegible] o meglio di [illegible], per mezzo di organi speciali detti spore, le quali si formano nell'in-

terno della cellula stessa. La formazione di spore è stata finora sicuramente osservata nei bacilli soltanto; per quanto taluni dicano di averla trovata anche in qualche specie di vibrioni e di batteri, e lo Zopf asserisca che financo nei cocci si può talora osservare lo stesso fenomeno. Le condizioni necessarie a che si producano spore non sono ancora ben determinate: si può dire tuttavia che, 1° una certa composizione del substrato nutritivo, 2° l'esaurimento dei materiali di nutrizione e 3° un certo grado di temperatura son necessarî per avere lo stadio di fruttificazione di questi esseri.

L'influenza della temperatura sulla sporificazione è la più notevole di tutte. Il Koch ha trovato che pel bacillo carbonchioso è necessaria, perchè si formino spore, una temperatura di 16° C. almeno, e che inoltre il tempo necessario alla formazione di queste si fa tanto più breve, quanto più si eleva il grado di temperatura, ben inteso fino ad un certo limite che non sia nocivo alla vita di quei bacilli.

Nella maggior parte dei casi prima della comparsa delle spore i bacilli si allungano in filamenti, i quali si intrecciano fra di loro; poi comincia una segmentazione dei filamenti stessi, e nel loro interno compaiono piccoli corpicciuoli rotondeggianti e fortemente rifrangenti la luce, i quali si allineano come una filza di perle entro i bacilli; questi poi a poco a poco si sciolgono, e le spore allora diventano libere.

Ma non sempre la cosa è così; in altri casi i bacilli non crescono in lunghi filamenti, ma invece si ingrossano, diventano fusiformi, oppure ellissoidi e claviformi, il loro contenuto si intorbida e compare la spora. Questo sarebbe il processo di sporificazione che si verifica ad es., nel « Clostridium butyricum » secondo il Prazmowsky.

In alcune osservazioni fatte sul modo di crescere e di svilupparsi di quel microparassita normale dell'epidermide, descritto dal Bizzozero col nome di «Leptotrix epidermidis», lo scrivente ha potuto osservare che la formazione di spore avviene in una terza maniera, che si può dir quasi la combinazione delle due

precedenti; i filamenti, cioè, si dividono prima in bastoncini di varia lunghezza, i quali si ingrossano e si fanno panciuti assumendo una forma di fuso, nell'interno del quale si produce la spora.

Le *spore* isolate hanno forma sferica o per lo più ovale, e vi si distingue una membrana ed un contenuto fortemente rifrangente la luce, tanto da offrire l'aspetto di goccioline di grasso. Non si colorano cogli ordinari metodi di colorazione, almeno finchè sono in vita: recentemente però il Buchner è riuscito a colorarle, esponendole prima per un'ora circa ad una temperatura di 150° C.

Le spore, se poste in condizioni favorevoli di nutrizione e di temperatura, possono germogliare e riprodurre la forma di bastoncino. Per lo più ciò non avviene se non dopo un lungo stadio di riposo, ed in generale in un substrato materiale diverso da quello ove le spore stesse si sono formate. Però circa alla germinazione delle spore ed alle condizioni della stessa non si posseggono ancora osservazioni sufficienti: si può dire tuttavia che condizioni indispensabili sono una certa quantità di contenuto di acqua ed un grado di temperatura oscillante entro limiti non molto estesi. Quanto all'ossigeno, la sua presenza è necessaria per la germinazione della maggior parte delle spore, mentre è invece d'ostacolo allo schiudersi di alcune, ad esempio di quelle del «bacillus butyricus».

L'atto del germogliamento delle spore è stato descritto dal Koch come un semplice allungarsi in bastoncino: mentre secondo il Prazmowsky ed il Brefeld si formerebbe o ai poli o all'equatore della spora una specie di bottone, ed in questo punto rompendosi la membrana, verrebbe fuori il contenuto protoplasmatico, che si allunga a grado a grado fino a diventare un bacillo.

Le spore hanno un grande interesse scientifico perchè stabiliscono in modo sicuro la posizione di questi esseri nel mondo vegetale, ma ne hanno anche uno maggiore dal punto di vista dell'igiene; giacchè mentre la forma di vegetazione in certe condizioni facilmente si estingue, le spore invece posseggono un

notevolissimo potere di resistenza contro gli agenti fisici e chimici, coi quali noi cerchiamo di combattere questi nostri nemici, e rappresentano la *forma durevole*, destinata ad assicurare la vita della specie, che sarebbe altrimenti di continuo minacciata dalle influenze esterne nocive.

Le spore infatti sono dotate di una vitalità assai superiore a quella della forma vegetativa degli stessi microrganismi, e resistono all'azione dell'acqua, dell'alcool e di altri reagenti chimici; resistono al disseccamento, a sbilanci di temperatura perfino di 200° C. (— 100° a + 100°), all'azione dell' ossigeno compresso ecc. ecc.

Le spore a secco possono sopportare senza morire anche un calore di 130° C. e più; si ritiene però in generale che, tenuto a 150 — 160° C. per un'ora, qualunque genere di spore venga ucciso. Resistono invece assai meno al calore umido, ed il Pasteur ha trovato che resistono di più se si trovano in soluzioni alcaline. Si può in qualche caso utilizzare la proprietà che hanno le diverse specie di spore di offrire un diverso potere di resistenza all'azione del calore, per ottenere allo stato di purezza qualche forma di microbi.

B) Proprietà fisio-patogeniche.

Nutrizione.

Per quanto finora incompletamente conosciute, le proprietà fisiologiche dei microrganismi rappresentano una delle parti più importanti dello studio della eziologia delle malattie da infezione, poichè sono queste che ci devono guidare nella scelta dei mezzi preventivi destinati a distruggere il potere nosogenico dei parassiti. La nutrizione di questi esseri si fa, come ho detto, a spese

delle sostanze organiche già composte, sieno queste idrocarbonate, oppure azotate od albuminoidi, a condizione però che le stesse sieno *solubili nell'acqua e si trovino in soluzione non troppo concentrata.* Sono necessarie inoltre alla loro nutrizione anche le sostanze minerali, e specialmente lo zolfo, il fosforo, il potassio (o rubidio o cesio) e il calcio (o magnesio o bario). L'acido carbonico viene loro fornito dagli idrati di carbonio solubili nell'acqua: di questi più specialmente appropriati sono, secondo il Nägeli, le varie specie di zucchero, la mannite e la glicerina; vengono in seconda linea i diversi composti degli acidi grassi e le combinazioni alcaline dell'acido tartrico, citrico, malico, lattico, acetico ecc.

L'azoto libero non viene assimilato dai microrganismi, ma questi lo prendono dalle sostanze albuminoidi, e specialmente da quelle appartenenti al gruppo delle amine e delle amidi (acetamide, propilamina, metilamina, asparagina, leucina), e dai sali di ammonio. Gli albuminati devono essere in forma diffusibile, e vengono perciò cangiati anzitutto in peptone per opera di un fermento prodotto dagli stessi microbi. L'azione loro peptonizzante è assai energica quando le soluzioni sono neutre od alcaline. Le sostanze azotate più adatte alla nutrizione dei microbi sono, in iscala decrescente, l'albumina (peptone) e zucchero, la leucina e zucchero, il tartaro d'ammonio e zucchero, l'albumina (peptone) sola, la leucina, il tartrato d'ammonio e l'asparagina. Lo zolfo è, secondo Nägeli, indispensabile per la nutrizione di tali esseri, e viene loro fornito dai varii sali dell'acido solforico e solforoso. Le altre sostanze minerali sono tolte dai relativi composti salini.

Queste cose che riguardano il materiale di nutrizione dei microparassiti sono necessarie a sapersi, per ottenere lo sviluppo di questi al di fuori dell'organismo in substrati organici appropriati. Non devesi però dimenticare che ciascuno ha una speciale predilezione per certi materiali nutritivi anzichè per altri; o a meglio dire, non tutte le sostanze di sopra nominate sono acconcie egualmente per lo sviluppo di tutti e singoli i microrga-

nismi patogeni; sicchè quando voglia imprendersi uno studio nuovo, bisogna avere l'avvertenza di provare contemporaneamente parecchie e svariate miscele nutritive.

Quindi non può darsi alcuna regola generale sui rapporti quantitativi di ciascuna sostanza nutriente che sono più favorevoli allo sviluppo dei microbi, variando assai per ciascuna specie degli stessi. In generale però il contenuto di acqua dev'essere grande, e poca invece la concentrazione del mezzo nutritivo. I limiti entro cui può oscillare il contenuto di acqua non sono bene precisati, ma devono essere abbastanza ampii, dal momento che i microbi vegetano bene tanto in soluzioni piuttosto concentrate (15-20 °/₀ di sostanza solida), come in quelle che non contengono che traccie di materiali disciolti. Quando però il contenuto d'acqua si abbassa al disotto di un certo limite, lo sviluppo dei microrganismi si arresta; su questo fatto è basata l'azione conservatrice delle sostanze organiche, operata dai composti salini avidi di acqua.

Nell'acqua che sia priva di qualunque sostanza disciolta i microbi muoiono presto: le spore invece si mantengono molto più a lungo. L'essiccamento li uccide egualmente in un lasso di tempo che varia per ogni singola specie.

Quanto all'OSSIGENO, questo gaz ha rapporti affatto diversi colle varie specie di microbi. È nota ormai la divisione che ne ha fatto il Pasteur di *aerobî* od *aerofiti*, ed *anaerobî* od *anaerofiti*, basandosi appunto sul modo di comportarsi verso l'ossigeno: in seguito anche osservazioni recenti hanno confermato che per lo sviluppo di alcune specie è assolutamente necessaria la presenza dell'ossigeno libero (aerobî), mentre altre non possono sviluppare in presenza dello stesso gaz (anaerobî).

Un'osservazione più dettagliata ha però dimostrato che una divisione assoluta nel senso del Pasteur non può ammettersi, e che piuttosto si possono sotto questo rapporto distinguere tre gruppi di microrganismi. Il primo è di quelli che si sviluppano soltanto in miscele fermentanti e con esclusione assoluta di O. La vera fermentazione ha luogo soltanto se non vi è la pre-

senza di quel gaz, ed in miscugli fermentati i microrganismi specifici si moltiplicano benissimo, mentre invece la presenza dell'O ne arresta lo sviluppo e fa cessare la fermentazione. Questi sarebbero i veri *anaerobi* (es. il « bacillus butyricus »), per quanto però possa ammettersi che si troveranno forse anche per questi alcuni mezzi di nutrizione che non fermentano, e che ne permettono tuttavia lo sviluppo in presenza dell'ossigeno. Un secondo gruppo è costituito da quelli che crescono facilmente in substrati non fermentescibili, ma che sotto certe condizioni, e se si trovano con sostanze capaci di fermentare, producono la fermentazione. Questi allora nel primo caso sono *aerobi*, ossia hanno bisogno assoluto di ossigeno libero, e nel secondo invece possono crescere e produrre la fermentazione tanto in presenza dell'O., come quando questo non vi è. Il terzo gruppo finalmente comprenderebbe quelli che non son capaci di produrre alcuna fermentazione, e che sono perciò aerobi squisiti. È dubbio però se esista realmente un tal gruppo, o se piuttosto non si conoscano ancora le sostanze fermentescibili adatte per queste specie di microrganismi.

Azione dei microrganismi sui mezzi di nutrizione.

L'azione dei microrganismi sui mezzi di nutrizione nei quali si sviluppano varia nei suoi effetti secondo la natura dell'essere vivente e secondo la proprietà del substrato materiale. Ve n'ha di quelli che producono materie coloranti (« micrococcus prodigiosus, m. aurantiacus »), altri che determinano processi di fermentazione, altri che sviluppandosi sulle sostanze organiche prive di vita le decompongono determinandone la putrefazione, ed altri infine i quali sviluppandosi nel sangue, oppure nei tessuti dell'organismo animale vivente lo rendono ammalato: e questi sono i microrganismi patogeni propriamente detti.

Per noi interessano specialmente soltanto quelli appartenenti alle due ultime categorie, giacchè il loro modo d'agire sarebbe

darci la chiave per ispiegare l'essenza delle malattie da infezione, qualora fosse però sufficientemente conosciuto.

Nella putrefazione avviene la decomposizione dei materiali albuminoidi, e si producono sostanze che agiscono in modo deleterio sull'organismo animale. Lo Schmiedeberg ed il Bergmann sono riusciti ad isolare dai liquidi putrefatti un corpo speciale velenoso, simile agli alcaloidi, che designarono col nome di *sepsina*. Il Selmi ha pure studiato i prodotti della putrefazione, raggruppandoli sotto la denominazione di *alcaloidi cadaverici* o *ptomaine*. In seguito anche lo Zülzer ed il Sonnenschein ottennero isolato un altro corpo alcaloidiforme, simile all'atropina; ma con tutto ciò regna anche adesso una grande oscurità sulla genesi di questi veleni. Più recentemente ancora il Brieger (1) ha isolato dalle carni in putrefazione due altre sostanze aventi proprietà venefiche, simili agli alcaloidi e prodotte dallo sviluppo dei microbi specifici di quel processo.

Ma fra i prodotti più importanti dello scambio materiale di certi microrganismi vanno annoverate alcune sostanze dotate di un potere speciale, i cosidetti *fermenti chimici* solubili. Io non posso entrare in dettagli a questo riguardo, ma debbo soltanto accennare al fatto che taluni microrganismi producono nel loro scambio materiale sostanze chimiche speciali, che si possono isolare dagli individui cellulari e che agiscono da fermenti (*enzimi*) su alcune sostanze organiche; mentre i processi di vera fermentazione sono dovuti ai fenomeni di nutrizione dei microrganismi specifici, e non hanno nulla a che fare coll'azione dei cosidetti fermenti chimici.

Lo studio di queste sostanze speciali prodotte dallo sviluppo dei microparassiti è ancora tutto da farsi, e riuscirà senza dubbio fecondo di risultati interessanti per la conoscenza del modo d'agire degli stessi nel produrre i fenomeni morbosi.

---

(1) Brieger, *Ueber giftige Producte der Fäulnissbacterien*, Berliner klinische Wochenschrift, N. 14. 1884.

lattie da infezione e si sogliono distinguere in due sottogruppi; il primo è di quelle in cui l'infezione penetra nell'organismo da una ferita, ossia da una lesione qualunque della superficie corporea (Wundinfectionskrankheiten dei tedeschi), e l'altro invece di quelle in cui l'infezione si sviluppa senza il concorso di alcuna lesione esterna, almeno apparente. Questa divisione è però artificiale, giacchè non esiste un confine netto fra le due specie di malattie, ed anzi generalmente si ammette che anche in quelle della seconda categoria l'agente infettante entri per qualche piccola soluzione di continuo, sia delle mucose, sia dell'involucro cutaneo esterno. Pare inoltre accertato che alcuni dei microparassiti trovano già un terreno appropriato al loro sviluppo nell'organismo sano, ove possono crescere e riprodursi, e che altri invece non possono attaccare un organismo che sia completamente normale, ma trovano piuttosto il momento favorevole al loro sviluppo, soltanto quando le proprietà fisico-chimiche dei tessuti si alterano in una maniera qualsiasi.

Nelle malattie del 1° gruppo, in cui l'agente infettante penetra nell'organismo da una lesione di continuo, l'imagine clinica e anatomo-patologica è diversa secondo che il microparassita si diffonde soltanto nel tessuto circumambiente e nei vasi linfatici, oppure penetra invece nel torrente circolatorio sanguigno e va ad invadere territorî lontani e molteplici. Si distingue, adunque una azione *locale* ed un'azione *generale* dei microrganismi patogeni. Quanto alla prima, allorchè uno di questi esseri si insedia in un tessuto e vi si moltiplica, penetra negli interstizii fra cellula e cellula ed anche nell'interno della cellula stessa, la quale a poco a poco perde la sua vitalità e muore. In conseguenza adunque dello sviluppo locale dei microparassiti si ha in generale la degenerazione dei tessuti e la *necrosi* consecutiva; da questa si ha poi l'irritazione dei tessuti circumambienti e la reazione infiammatoria essudativa e spesso emorragica. Non di rado questo processo reattivo è salutare, perchè si forma dattorno uno strato denso di connettivo che impedisce l'ulteriore diffondersi dei parassiti: spesso però questi penetrano a poco a poco nelle vie

linfatiche, od anco nelle sanguigne, ed emigrano in organi lontani a riprodurre, là dove si fermano e dove trovano le condizioni favorevoli al loro sviluppo, gli effetti di distruzione ora descritti.

Per dare alcuni esempi di queste varie specie di malattie da infezione, voglio accennare anzitutto alla «necrosi progressiva» dei tessuti osservata dal Koch nei topi bianchi. In questa il microrganismo patogeno si diffonde lentamente dal punto dell'innesto ai tessuti vicini, producendo la necrosi e sviluppandosi progressivamente a spese del tessuto necrotizzato. Allora o l'accrescimento del parassita si generalizza e produce la morte dell'animale, oppure i tessuti vicini reagiscono fortemente, s'infiammano ed oppongono così una barriera all' ulteriore invasione del parassita.

Diversamente invece si compie lo sviluppo del «bacillo dell'edema maligno» nei tessuti. Quest'ultimo è uno squisito anaerobio, e quindi non può svilupparsi nel sangue e diffondersi con questo, e neppure si sviluppa da piccoli innesti o da lesioni esterne poco estese, ma si riproduce soltanto quando esiste in gran copia in un tessuto già mortificato, e quando la ferita non è più in contatto dell'aria.

Il «micrococco della risipola» si diffonde per la via dei linfatici, e produce perciò soltanto un'affezione locale limitata che si diffonde nella pelle a poco a poco. Altri microrganismi, come sono quelli della pioemia e della setticemia, penetrano facilmente nel sangue ed invadono tutto l'organismo; si sviluppano nel sangue circolante e specialmente nei piccoli vasi, i quali possono venire da quelli perfino otturati. Il movimento del sangue sembra però che sia una condizione poco favorevole allo sviluppo dei microparassiti; ed infatti fino a che l'organismo è vivente, questi si trovano in generale nel sangue degli animali, colpiti da quelle malattie, in numero scarso, mentre poi si sviluppano rapidamente appena cessa il movimento e la vita. Questo fatto è da tenersi bene a memoria nel fare gli esperimenti di innesto dei materiali infettanti negli animali, per ricordarsi che

non si può mai giudicare del numero e della diffusione dei microbi nelle vie circolatorie e da queste nei tessuti, quando la necroscopia non sia stata eseguita appena dopo la morte.

Alcuni microparassiti penetrati nel sangue tendono specialmente ad otturare i più piccoli capillari, producendo la necrosi dei tessuti ambienti e quindi ascessi molteplici (pioemia). Esempi bellissimi di questo modo di diffondersi e di agire dei microrganismi, nella pioemia e nella setticemia, si hanno nel bacillo della setticemia dei topi e nel batterio della setticemia dei conigli, nelle quali malattie il Koch ha dimostrato che in tutti i distretti capillari avvengono alterazioni per opera di tali parassiti.

Anche nelle malattie del secondo gruppo l'infezione ha luogo per lo più nella stessa maniera. In alcuni casi è una piccola lesione della mucosa che serve di porta d'ingresso, mentre altre volte, specialmente in quelle malattie che si diffondono con rapidità, l'agente morbigeno penetra per le vie naturali dell'organismo senz'alcuna lesione apparente. Tale questione è però quasi impossibile a decidersi, poichè nella mucosa delle vie respiratorie, e specialmente in quella della bocca e delle fauci, si formano facilmente piccole lesioni o perdite d'epitelio, che passano inosservate, e che possono benissimo costituire una porta d'ingresso per l'invasione dei microbi. Nella mucosa degli organi digerenti si ha poi un rivestimento epiteliale capace di assorbimento, e quivi perciò si avrebbero anche normalmente condizioni assai favorevoli al prodursi di un'infezione, qualora non vi fosse l'azione protettrice dei succhi digerenti e dei processi stessi di digestione. Difatti le varie specie di microbi patogeni finora conosciute sono assai sensibili verso gli acidi, e l'acidità del succo gastrico e degli ingesti serve ad impedire il loro sviluppo. Sfortunatamente però l'azione protettrice dei succhi digerenti non è completa, ossia non si estende alle spore, giacchè il Koch facendo ingerire agli animali le spore del bacillo carbonchioso ha visto prodursi l'infezione, mentre .questa non si produce se si fa ingerire agli stessi il virus sotto forma di semplice bacillo.

Finalmente anche la mucosa degli organi genito-urinari può servire di strada all'entrata dei microparassiti, specialmente col mezzo di piccole lesioni di continuità.

In qualunque modo penetrino questi esseri nell'organismo animale, perchè poi si moltiplichino e ne origini una malattia da infezione, sono necessarie due condizioni generali: la prima è che i microrganismi abbiano speciali proprietà vitali che li facciano attecchire nel corpo vivente; e la seconda che esista in questo una predisposizione, sia generale, sia locale dei tessuti i quali rappresentano la porta d'ingresso pel virus infettante. Ma intanto quali sieno le particolarità che deve aver un microbo per essere patogeno, ossia per produrre l'infezione, noi non lo sappiamo, come non sappiamo egualmente quale sia il suo modo di agire nel produrre i fenomeni della malattia.

Ho già accennato più sopra alle ipotesi molteplici che si sono emesse per trovare una interpretazione a questi fatti, i quali non possono nel più dei casi venire spiegati coi semplici effetti meccanici dell'invasione dei microparassiti nell'interno degli organi e dei tessuti. Il numero e la diffusione degli stessi nell'organismo non sembra anzi che abbia alcun rapporto coll'intensità dei fenomeni morbosi, come si vede, ad es., nei casi di pustola maligna nell'uomo, in cui si ha una tumefazione isolata senza che succeda diffusione di sorta al resto dell'organismo. In tali casi, per ispiegare la gravità dei sintomi morbosi generali, si è costretti a ricorrere all'esistenza di sostanze velenose prodotte dallo sviluppo dei parassiti. In questo campo però le osservazioni sono ancora troppo scarse, per potere stabilire alcunchè di positivo. Sarebbe invero interessantissimo di estendere queste ricerche sui prodotti dello scambio materiale dei varii microrganismi patogeni, per poterne comprendere in qualche modo il meccanismo d'azione. Il Brieger ha studiato le decomposizioni che avvengono nei mezzi di nutrizione per lo sviluppo dei pneumococchi, ed ha trovato che, coltivandoli nella soluzione di zucchero, si svolge acido carbonico e si forma una certa quantità di acido acetico.

Come ci è sconosciuto il modo d'agire, così ho detto che noi

non sappiamo neppure per quali proprietà possano i microparassiti moltiplicarsi nel corpo vivente, mentre le altre moltissime forme di microbi che ne rivestono la superficie, e quelle che noi introduciamo continuamente coll'aria e cogli alimenti, non sono capaci di moltiplicarsi finchè l'organismo è vivo, ma crescono invece benissimo sul corpo privo di vita.

Anche perciò si sono immaginate un mondo d'ipotesi, qual più qual meno razionale, che qui non è il luogo di riferire. Voglio accennare soltanto ad un'idea recentemente sostenuta dal Metschnikoff, idea che è molto seducente, ed anche fondata su qualche fatto d'osservazione positiva. Il Metschnikoff (1), studiando una malattia parassitaria delle « dafnie » (pulci d'acqua), ha osservato che le spore del fungo patogenico, a mano a mano che entravano nella cavità addominale della dafnia, venivano divorate dalle cellule amiboidi incolori del sangue, ed in queste morivano disfacendosi in granuli. Se veniva inghiottita una piccola quantità di quelle spore, tale cioè da poter essere tutte assorbite dai corpuscoli sanguigni, la malattia non si sviluppava; se invece ciò non era possibile, o pel numero grande di spore introdotte o per altre condizioni speciali, tutto il corpo era invaso dai parassiti e l'animale moriva. In questo caso, come si vede, si avrebbe una vera lotta per l'esistenza fra le cellule amiboidi ed i microbi, e le prime si comporterebbero come cellule divoratrici, come veri *fagociti*.

Egli ha fatto pure osservazioni importanti sul virus carbonchioso, ed ha visto che i bacilli innestati sotto la cute della rana, la quale, come è noto, nelle condizioni di vita ordinarie si mostra

---

(1) METSCHNIKOFF, *Ueber eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien. Beitrag zur Lehre über den Kampf der Phagocyten*, Virchow's Archiv, Bd. 96, Heft. 2, p. 177 ff.

Lo stesso, *Ueber die Beziehung der Phagocyten zu Milzbrandbacillen*, Virchow's Archiv, Bd. 97, Heft 3, p. 502 ff.

Lo stesso, *Ueber die pathologische Bedeutung der intracellular Verdauung*, Fortschritte der Medicin, N. 17, 1884.

refrattaria a questa malattia, dopo qualche giorno si vedono tutti incorporati nei leucociti, ed han perduto in pari tempo la loro virulenza. Nelle rane innestate collo stesso materiale, ma col metodo di Gibier, che consiste nel tenere l'animale riscaldato a 37-38° C., e fatte ammalare così di carbonchio, i bacilli non si trovano più rinchiusi nei leucociti, ma si trovano bensì nel sangue circolante e nei tessuti.

Malgrado che questi siano fatti isolati, e che si possa contro gli stessi sollevare qualche obbiezione, pure non cessano perciò dall'avere come fatti bene osservati un certo valore; tanto più che stanno in armonia con altri consimili, già dimostrati in precedenza a riguardo del processo di distruzione dei globuli sanguigni rossi, e a riguardo dell'eliminazione dall'organismo di altre sostanze eterogenee, fatta egualmente per opera dei leucociti.

Queste osservazioni meritano una seria attenzione, e se venissero estese e conformate, servirebbero a gettare molta luce non solo sulla patogenia dei sintomi morbosi delle malattie d'infezione, ma anche su altre questioni riguardanti queste stesse malattie, e specialmente sull'immunità prodotta cogli innesti preservativi dei virus attenuati.

Attenuazione del potere patogenico.

Immunità naturale ed artificiale.

Fra le proprietà fisiologiche dei microbi va pure annoverata quella dell' attenuazione del loro potere nosogenico, in modo che, innestati poi nel corpo vivente, non sono più atti a sviluppare che fenomeni morbosi di grado assai leggero. Fu il Toussaint il primo che trovò che riscaldando il sangue carbonchioso fino a 55° C., ed aggiungendovi da $^1/_2$-1 $^0/_0$ di acido fenico, i bacilli perdevano la loro virulenza. In seguito lo Chauveau ha osservato che anche col semplice riscaldamento a 52° C. si otteneva dopo 15 minuti l'attenuazione dello stesso virus; ed il Pasteur, coltivando i bacilli carbonchiosi nel brodo di carne

neutralizzato a 40-43° C., ottenne la diminuzione delle loro proprietà patogeniche, tanto che non erano più atti a produrre la morte degli animali.

Studî più esatti a questo riguardo furon eseguiti poi dal Koch, Gaffky e Löffler (1) i quali hanno confermato i fatti suaccennati, ed hanno inoltre trovato che mantenendo le culture del bacillo carbonchioso a 42-43° C., l'attenuazione comincia già a manifestarsi al sesto giorno, all'ottavo e decimo è già considerevole, ed al ventesimo giorno è completa.

Ma quello che è più importante si è che i bacilli, così attenuati nella loro virulenza, non hanno perduta con ciò la facoltà di svilupparsi sulle sostanze di nutrizione, ma crescono in queste nella stessa maniera che i bacilli virulenti, mantenendo cioè eguali e costanti le loro proprietà morfologiche. Gli autori suddetti hanno pure dimostrato che i bacilli non perdono il loro potere infettante in un tempo eguale per tutti gli animali, giacchè i topi bianchi vengono ancora uccisi coll'innesto di culture, che sono già diventate innocue per i conigli e per le cavie.

Quanto più elevata è la temperatura, tanto più presto si ottiene l'attenuazione del virus, cosicchè questa piuttosto che ad un'azione attenuante dell'ossigeno, come crede il Pasteur, devesi riferire all'influenza della temperatura.

Un altro fatto di grande interesse teorico, pure osservato dal Koch e dai suoi scolari, è che il bacillo carbonchioso, una volta attenuato, rimane tale in tutte le coltivazioni successive, fatte nei substrati artificiali i più svariati o nell' organismo animale, senza che più riacquisti la sua virulenza neanche dopo anni. Ciò è importante specialmente per riguardo all'opinione di coloro i quali ammettono che le proprietà fisiologiche e patogeniche dei microrganismi non sieno ereditarie e preesistenti, ma sibbene dipendano dal terreno su cui questi si sviluppano.

---

(1) Koch, Gafky u. Löffler, Mitth. a. d. Kais. Ges., Bd. II, 1884.

L'attenuazione delle proprietà infettanti si ottiene non solo mediante l'azione della temperatura, ma anche talora cogli innesti successivi fatti su date specie di animali, come ha trovato il Pasteur pel virus del così detto «mal rosso» dei suini (Schweinerothlauf); il quale virus coltivato in una serie di conigli, da uno all'altro successivamente, perde a poco a poco le sue proprietà infettanti verso i suini. Il Pasteur sarebbe pure riuscito ad attenuare il virus del colèra dei polli.

Le cause prossime dell'attenuazione e del ripristino della virulenza non sono conosciute e meritano di esser ancora esattamente studiate. Il Metschnikoff (1) avrebbe osservato che negli animali innestati col virus carbonchioso attenuato si trovano sul sito dell'innesto un gran numero di leucociti, i quali hanno divorato i bacilli (fagociti); e che inoltre in uno di questi animali, ch'egli avea reso immune coll'innesto preventivo di quel virus, e nel quale avea poi inoculato i bacilli virulenti, i leucociti erano aumentati di numero e ripieni di bacilli, mentre nessuno di questi ultimi trovavasi libero nel plasma. Questo fatto, qualora venisse confermato con altre osservazioni, servirebbe in parte a spiegare il fenomeno dell'immunità che si ottiene coll'innesto di alcuni virus attenuati; giacchè in questo caso i leucociti, addivenuti più numerosi, sarebbero destinati a distruggere gli elementi parassitari estranei all'organismo.

Un'altra proprietà, cui debbo accennare, è quella che i microbi patogeni non crescono egualmente bene in qualunque degli organismi animali, ma taluni invece sono patogeni per una specie, ed altri per un'altra, e gli uni e gli altri sono poi innocenti per gli animali di specie diversa. Anche le varietà le più affini presentano sotto questo riguardo diversità sorprendenti: così ad esempio i topi di campagna sono affatto immuni da quella forma di setticemia studiata dal Koch, che è estremamente letale pei topi domestici; mentre poi lo stesso virus nei conigli

---

(1) **Metschnikoff, Lavori citati.**

provoca soltanto un'affezione locale e passeggiera. Il virus della cosidetta « setticemia dei conigli » uccide sicuramente i conigli ed i topi bianchi; le cavie ed i ratti ne sono invece immuni, le passere ed i colombi ne sono suscettibili.

E non solo le varie specie, ma anche i singoli individui della stessa specie reagiscono diversamente verso gli stessi microparassiti; così i cani giovani prendono facilmente l'infezione carbonchiosa, e quelli vecchi no. È a tutti noto infatti che non basta la presenza del virus infettante, ma è pure necessaria la cosidetta *disposizione individuale* perchè si sviluppi una malattia da infezione. A lato della disposizione generale dell'individuo sembra, specialmente dai fatti recentemente osservati, che si debba ammettere anche una *disposizione locale*. Certo è che il luogo d'ingresso dei microbi ha un'importanza notevole; e lo dimostra, ad es., il fatto osservato dal Koch, che i conigli innestati col materiale setticemico sotto la cute della nuca muoiono coi sintomi dell'infezione generale, mentre inoculando lo stesso materiale nell'orecchio, si ottiene soltanto un'affezione localizzata.

Recentemente il dottor Passet (1) nelle sue osservazioni sui microrganismi piogeni è giunto alla stessa conclusione, che cioè la specie dell'infezione dipende anche dalla località da cui procede l'invasione del parassita. Finalmente io stesso (2), in alcune ricerche sperimentali fatte sulla « pioemia dei vitelli neonati », ho osservato che iniettando il medesimo materiale, preso dalla vena porta infiammata dei vitelli, nelle cavie sotto cute o nelle vene, otteneva nel primo caso la pioemia con ascessi multipli, e nel secondo la micosi settica del sangue semplicemente.

Come esiste una predisposizione, esiste anche viceversa una *immunità individuale* per le stesse malattie; ma quale sia la causa da cui dipendono questi fatti, non è ancora conosciuta. In

---

(1) Passet, *Ueber Mikroorganismen der eitrigen Zellgewebsentzündung des Menschen*, Fortschritte der Medicin, N. 2 e 3, 1885.

(2) Bordoni-Uffreduzzi, *La Pioemia dei vitelli neonati*, Archivio per le scienze mediche, Ottobre 1884.

alcuni casi può essere forse la mancanza di una porta d'ingresso, la mancanza cioè di lesioni di continuo sia della pelle che delle mucose, o la mancanza di infiammazioni superficiali, oppure uno spessore più grande del tegumento la causa che protegge l'individuo dall'invasione dell'agente morbigeno. Altre volte invece possono essere differenze individuali della pressione sanguigna, o della funzione renale, o dello scambio organico in genere quelle che determinano l'azione diversa dell'agente infettivo. Spesso i microparassiti non allignano che su organi già precedentemente ammalati, come sembra essere il caso del bacillo della tubercolosi nei polmoni.

L'immunità individuale non è soltanto primitiva, ma si può anche acquistare dopo aver sofferto una volta quella certa malattia. Non tutte però le malattie infettive dànno questa immunità, ed anche se la dànno, non è sicura per tutti gli individui e non dura in tutti lo stesso tempo. Questa specie d'immunità è stata anche provata sperimentalmente: così il piccolo bacillo della setticemia dei topi, che nei conigli produce un'affezione semplicemente locale, se s'innesta una seconda volta nello stesso animale rimane inattivo. Similmente avviene nel così detto carbonchio sintomatico, in cui l'innesto di una piccola dose di virus procura l'immunità per gli innesti successivi. Più sorprendente è ancora il fatto che l'immunità si può anche avere coll'innesto non dello stesso virus ma di un virus somigliante. Questo è il caso appunto del vaccino e del vaiuolo.

Recentemente alcuni sperimentatori hanno cercato di trar partito dal fatto di sopra menzionato, dell'attenuazione di alcuni virus infettanti, per produrre *un'immunità artificiale*. Il Toussaint, lo Chauveau ed il Pasteur han potuto coll'innesto del virus carbonchioso attenuato rendere immuni gli animali dal carbonchio naturale. Il Pasteur per rendere immuni le pecore ed i buoi usa due innesti, un primo innesto col virus fortemente attenuato ed un secondo col virus attenuato debolmente. Il Koch ha potuto stabilire in maniera più esatta il grado di attenuazione dei due virus necessaria allo scopo deducendo da una lunga serie di

esperimenti fatti sugli animali che il virus è divenuto adatto pel primo innesto, quando uccide ancora i topi bianchi ma non uccide più le cavie, e pel secondo innesto, quando uccide le cavie ma non uccide più i grossi conigli. E questo è un gran progresso introdotto nella pratica tuttora difficile ed incerta della preparazione di questo virus, giacchè prendendo per reagenti le tre specie di animali anzidette, topi, cavie e conigli, si può, iniettando di quando in quando in questi animali il virus che si fa attenuare a temperatura elevata, ottenere precisamente quel grado di attenuazione che si desidera.

Il Koch ha pur dimostrato che, se l'innesto preventivo fatto col metodo di Pasteur rende immuni gli animali verso il carbonchio artificiale (inoculazione), non produce del pari sicuramente l'immunità verso il carbonchio naturale. Questo difatti, secondo le esperienze del Koch, avviene non già per una specie d'innesto naturale, per l'ingresso cioè del microbo carbonchioso per qualche piccola lesione della mucosa orale o gastro-enterica, come vuole il Pasteur, ma sibbene per mezzo dell'ingestione di spore, le quali resistono all'azione dei succhi digerenti. Or bene contro quest'ultima specie d'infezione non riesce efficace l'innesto carbonchioso preventivo, il quale inoltre talora è tutt'altro che innocente. Malgrado però che non se ne possa trarre finora per la pratica tutto quel vantaggio che in principio si credeva, pure le esperienze relative all'attenuazione ed all'innesto di quel virus hanno un grande interesse, perchè hanno aperta una strada per poter forse ottenere l'immunità artificiale per altre malattie infettive.

Il Pasteur ha trovato che coll'innesto dei microbi attenuati del colèra dei polli si produce in questi una malattia passeggiera, che li rende immuni dallo innesto del virus ordinario. Più recentemente ancora lo stesso autore (1), coll'inocula-

(1) Pasteur, *Die Schutzimpfung gegen den Schweinerothlauf* (Traduzione dall'originale). Fortschr. d. Med., N. 1 (Beilage), 1884.

zione del virus attenuato del « mal rosso » dei suini, ha potuto rendere immuni questi animali verso la infezione naturale per più d'un anno, per quanto tempo, cioè, è durata la sua osservazione in un'epidemia di questo male. Il Klein (1) ha confermato questo fatto, ed ha inoltre constatato che con tal mezzo i suini restano immuni anche dagli innesti ulteriori.

Azione della luce e della elettricità sulle proprietà biologiche dei microrganismi.

Veniamo ora a parlare delle condizioni di vita principali dei microrganismi patogeni e del loro modo diverso di reagire verso alcuni agenti esterni, fisici e chimici. Si credeva per lo addietro che la luce non avesse una grande influenza sulla vita di questi esseri, che sono per la maggior parte privi di clorofilla. Recentemente però l'Engelmann (2) ha dimostrato che non solo la produzione del pigmento nei cromogeni sta sotto l'influenza diretta della luce, ma che anche il movimento proprio di certe specie di microbi è dipendente dall'azione della luce stessa. Inoltre i diversi colori sembra che esercitino un'azione diversa su certe proprietà biologiche dei microrganismi.

Riguardo all'azione dell'*elettricità*, le ricerche del Cohn e del Mendelsohn (3), fatte colla corrente galvanica, hanno dimostrato che solamente correnti elettriche molto forti possono arrestare lo sviluppo delle culture di certi microbi.

---

(1) Klein, *Die Bacterien der Schweineseuche*, Virchow's Archiv, Bd. 95, p. 468.

(2) Engelmann, *Bacterium photometricum. Ein Beitrag zur vergleichende Physiologie des Licht- und Farbensinnes.* Untersuchungen aus dem physiologischen Laboratorium zu Utrecht, 1882.

(3) Cohn u. Mendelsohn, *Ueber die Einwirkung des electrischen Stromes auf die Vermehrung von Bacterien*, Cohn's Beiträge, Bd. 3, Heft. 1.

Azione della pressione e del movimento.

I cangiamenti di pressione possono essere benissimo sopportati da alcuni microrganismi, ad esempio dal « bacillus butyricus », ma non si sa ancora se altre specie sieno in questo riguardo più sensibili. La quiete, la mancanza d'agitazioni meccaniche sembra favorire lo sviluppo dei microbi, giacchè mentre un movimento lento e continuo del liquido di nutrizione non impedisce il moltiplicarsi dei germi che vi sono contenuti, un movimento più rapido e scomposto lo rallenta (1). Questo è forse il motivo per cui nel sangue circolante degli animali che hanno una infezione generale (setticemia) i microrganismi mancano o sono assai scarsi, e si moltiplicano invece rapidissimamente appena dopo la morte.

Azione della temperatura.

Una grande influenza sulla vita di questi esseri la esercita la temperatura. In generale può dirsi che un certo grado di calore piuttosto elevato favorisce il loro sviluppo, mentre una temperatura bassa lo ritarda. Volendo dare una media, del resto molto approssimativa, del grado di temperatura più favorevole allo sviluppo dei microrganismi patogeni, questa è rappresentata all'incirca dalla temperatura nostra del corpo.

Però il loro accrescimento e la loro moltiplicazione progrediscono gradatamente coll'elevarsi della temperatura fino ad un *maximum*, sorpassato il quale, l'una e l'altra delle funzioni anzidette si illanguidiscono a poco a poco, finchè si spengono. Tanto il grado di temperatura più favorevole per l'accrescimento, quanto il limite più alto e quello più basso, nei quali è ancora possibile lo sviluppo dei microbi, è diverso per ciascuna

(1) Horwath, Pflüger's Archiv f. Physiol., Bd. 17.

specie degli stessi e varia anche nella stessa specie a seconda delle altre condizioni di vita, e specialmente secondo la composizione del substrato materiale che li alimenta. Così Eidam (1) ha trovato che lo sviluppo del « bacterium termo » nella soluzione nutritiva del Cohn comincia a 5°, 5 C. di temperatura, cresce lentamente fino a 10° C., e da qui in su rapidamente, fino a che a 30-35° raggiunge il massimo; decresce quindi in modo rapido coll'elevarsi ulteriore della temperatura, e cessa del tutto a 40° C. Il bacillo della tubercolosi cresce invece soltanto fra 30° e 41° C.; il grado più favorevole al suo sviluppo è di 37-38° C.

Si è detto che sonvi due limiti di temperatura, che col linguaggio ordinario chiameremo di *caldo* e di *freddo*, nei quali si sospendono le manifestazioni vitali dei microrganismi; non deve credersi però che col cessare di queste cessi del tutto anche la vita, poichè se si ripristinano di nuovo le condizioni opportune, ricompaiono bentosto anche i fenomeni vitali. Al di là ancora di questi limiti estremi cessa però anche la vita completamente. A questo riguardo è necessario portar l'attenzione su due fatti che hanno un grande interesse, specialmente per l'igiene; *anzitutto che il grado di temperatura che uccide i microbi varia assai secondo che si tratta della forma vegetativa degli stessi, oppure degli organi loro di riproduzione* (spore), *i quali sono sempre molto più resistenti; ed in secondo luogo che il calore umido è molto più attivo che non l'asciutto, per cui di quest'ultimo è necessario un grado assai maggiore per distruggere i microbi.*

Nell'aria calda, se la temperatura supera di poco i 100° C. e dura 1 ora e $^{1}/_{2}$, tutti i bacilli e micrococchi conosciuti finora muoiono. Le spore invece vengono uccise sicuramente soltanto dopo un soggiorno di 3 ore ad una temperatura di 140° C. Nell'acqua bollente invece le spore muoiono in due ore, e nel vapor d'acqua rinchiuso e compresso in 10 minuti. L'azione disinfettante del vapore acqueo è anche più energica, se questo è sovra-

(1) Eidam, Cohn's Beiträge, Bd. I, Heft. 3, pag. 209.

riscaldato ed è in movimento: cosicchè una corrente di vapore a 105° C. uccide in 10-15 minuti qualsiasi specie e qualsiasi forma di microrganismi, e penetra assai bene negli oggetti da disinfettare (Koch, Gaffky e Löffler). Il Wolffhügel ha trovato che nell'aria calda invece la temperatura penetra così lentamente negli oggetti da disinfettarsi, che anche dopo 3 o 4 ore di riscaldamento a 140° C, oggetti di una certa dimensione (pezzi di panno, guanciali ecc.) non sono ancora sicuramente disinfettati. Nell'usare l'acqua bollente bisogna sempre badare a che il momento della disinfezione comincia soltanto quando ogni parte dell'oggetto ha raggiunto i 100° C.

Dell'influenza della temperatura sulla sporificazione e sulla germinazione delle spore si è già parlato; e così pure si è detto dell'azione che la temperatura esercita su certe proprietà fisiologiche dei microrganismi patogeni, avuto riguardo specialmente alla diminuzione del loro potere infettante. La temperatura influisce pur anco sulla comparsa delle ciglia vibratili, e quindi sullo stato di movimento o di riposo degli individui cellulari, e secondo alcuni, anche sulla forma degli stessi. Si vede adunque quale notevole influsso eserciti il calore sulla vita dei microrganismi, e come sia necessario conoscerne le particolarità relative, sia per la pratica delle coltivazioni artificiali, sia specialmente per l'applicazione dei mezzi disinfettanti atti a distruggerli.

Azione dell'umidità e del disseccamento.

I microrganismi esposti all'aria hanno bisogno di un certo grado di umidità per conservarsi in vita. Anche per ciò, come per la temperatura, si comportano diversamente i bacilli e le spore; giacchè queste ultime resistono moltissimo all'azione del disseccamento, e si conservano vitali per anni ed anni. Il Buchner ha osservato che le spore del «bacillus subtilis», dopo tre anni che erano all'asciutto, si mantenevano ancora capaci di svilupparsi. Per alcune forme di bacilli invece basta anche il lasciarli

essiccati per breve tempo per ucciderli. Il Koch a riguardo dello spirillo del colera ha dimostrato che basta a distruggerlo l'azione del disseccamento prolungato per un'ora.

I micrococchi, specialmente se si trovano riuniti sotto forma di zooglea, resistono più a lungo alla mancanza di umidità ; forse ciò accade per l'azione protettrice dello ispèssimento della sostanza gelatinosa che li avvolge.

Azione del gaz.

Quanto all'azione che vi esercitano i gaz, si è già visto quanto diversamente si comportino i varî microrganismi di fronte all'ossigeno. Questo gaz sembra avere influenza, oltre che sullo sviluppo, anche sulle proprietà fisiologiche dei microbi, in ispecie sul movimento, e secondo il Pasteur, anche sul potere loro infettante. L'azione dell'acido carbonico e degli altri gaz non è ancora bene studiata.

Relativamente all'influenza che esercita l'ossigeno sulla mobilità dei microrganismi, l'Engelmann ha osservato che alcuni, ad es. quelli della putrefazione, sono tanto sensibili sotto questo riguardo alla presenza anche di quantità minime di O, che lo stato di quiete o di movimento degli stessi può servire come reagente delicatissimo per iscoprire la presenza di quel gaz.

Azione mutua.

Un'altra particolarità da rammentarsi, relativa allo sviluppo dei microrganismi, è la *concorrenza* che si fanno fra loro le varie specie degli stessi, allorquando albergano nello stesso mezzo di nutrizione. Quella specie, cioè, che ha per sè più favorevoli le condizioni di composizione e di temperatura del substrato materiale, si sviluppa prima e più rapidamente delle altre, tanto da giungere ad impedirne lo sviluppo. Questa proprietà è interes-

sante da un doppio punto di vista: anzitutto perchè la si può mettere a profitto per ottenere isolata una data specie di microbi, eppoi anche perchè può essere una sorgente di errore assai difficile a rilevarsi, e a cui si deve molto badare nel giudicare della purezza di una data cultura. Può darsi il caso infatti che, innestando in un mezzo di nutrizione due specie di microbi, una prenda il sopravvento sull'altra e ne impedisca lo sviluppo: i germi di quest'ultima rimangono pertanto sempre vitali, quantunque non si sviluppino; ed osservando al microscopio il prodotto di quella cultura, si può non vedere che una sola specie di microrganismi e crederla pura. Se però se ne fa un secondo innesto in una sostanza di nutrizione, che offra per lo sviluppo della specie rimasta sterile nella cultura primitiva condizioni più favorevoli che non per la prima specie, si avrà la poco grata sorpresa di vedere sviluppare una qualità di microbi tutt'affatto diversa da quella che si volea riprodurre. Questo fatto è occorso anche allo scrivente, in certe ricerche fatte sulle proprietà biologiche dei microparassiti cutanei normali, e costituisce forse, a mio avviso, una delle cagioni precipue d'errore che hanno condotto ad ammettere il polimorfismo dei microrganismi.

Azioni dei vari reagenti chimici.

Le varie specie di microbi si comportano diversamente verso gli *acidi:* mentre in alcuni anche un debolissimo grado di acidità del mezzo ne arresta lo sviluppo, in altri invece la presenza di acidi, specialmente di quelli vegetali, lo favorisce. Sono specialmente gli acidi minerali quelli che agiscono sui microbi in maniera deleteria. Questi sono invece meno sensibili all'azione degli *alcali*, ed anzi un certo grado di alcalinità favorisce l'accrescimento di molte specie di microrganismi.

L'azione che esercitano sulla vita e sullo sviluppo di questi esseri le varie sostanze, comprese nella classe dei cosidetti *disinfettanti*, è della più alta importanza per l'igiene. Una tale questione è entrata solamente da poco tempo in un terreno veramente

scientifico, ed a questo proposito il Koch e il Wolffhügel (1) hanno eseguito nel laboratorio d'igiene governativo di Berlino una serie di bellissime ricerche. Siccome non si avrà più occasione di entrare in simile argomento, accenneremo in breve a qualcuno dei più rilevanti risultati, relativi all'azione dei disinfettanti più comuni.

L'*acido fenico* in soluzione al 5 %₀ uccide in 24 ore le spore del bacillo carbonchioso, mentre una soluzione al 3 % anche in 24 ore non uccide sicuramente tutti i germi. I bacilli invece sono uccisi in pochi minuti con una soluzione fenica all'1 %. Una soluzione della stessa sostanza di 1 : 400 impedisce lo sviluppo di qualsiasi germe. I vapori dell'acido fenico alla temperatura ordinaria non hanno alcuna azione, mentre a 55° C. uccidono le spore in 2-3 ore.

Una soluzione di *cloruro di zinco* al 5 % non toglie alle spore del bacillo carbonchioso, che vi sono state immerse per un mese, la facoltà di germogliare.

L'agente chimico che esercita sui microparassiti l'azione più notevole è il *sublimato corrosivo*. Una soluzione di sublimato di 1 : 300,000 serve già ad impedire lo sviluppo delle spore (Koch), ed una di 1 : 20,000 le uccide in 10 minuti. Una soluzione di 1 : 5,000 è adunque un mezzo di disinfezione sicuro, anche se la durata dell'azione sia breve.

L'*acido solforoso* serve bene per distruggere i micrococci ed i bacilli, giacchè se questi sono aderenti ad un oggetto secco, e si tengono per 20-30 minuti in un'atmosfera che contenga 1 vol. % di acido solforoso, muoiono sicuramente. Invece l'azione dello stesso acido sulle spore è meno efficace: infatti, se si tengono le spore del bacillo carbonchioso o quelle del bacillo sottile, per 96 ore in un'atmosfera contenente il 5-6 per % di acido solforoso si mantengono tuttavia vitali, anche se si tro-

(1) Koch u. Wolffhügel, [illegible] mit [illegible] Mittheilungen [illegible] Bd. I, pag. 301.

vano in un mezzo umido. L'acido solforoso adunque, per la ragione eziandio che non penetra negli oggetti compatti, è un mezzo disinfettante assai mal sicuro.

Molto più energica invece è l' azione del *bromo,* del *cloro,* e dello *iodio.* Basta già una soluzione di iodio di 1 : 5,000, oppure una soluzione di bromo di 1: 1,500 per impedire lo sviluppo dei microparassiti. I vapori di bromo che si svolgono dalle soluzioni acquose uccidono le spore in 24 ore, quelle di cloro in due giorni. L'acqua di cloro e l'acqua di iodio uccidono le spore in un giorno, il cloruro di calce al 5 $^{0}/_{0}$ in 10 giorni.

L'acido benzoico, il benzoato di soda e la chinina hanno poca azione sulle spore. Altre sostanze, olii essenziali ed acidi vegetali in soluzioni concentrate, impediscono lo sviluppo dei microbi. L'olio di menta piperita agisce in tal modo già in una soluzione di 1: 30,000, l'olio di trementina in soluzione di 1: 75,000 e la chinina di 1: 800.

Bisogna ben ricordare che le sostanze disinfettanti agiscono solamente in soluzione acquosa; sciolte nell'alcool o nell'olio perdono molto del loro potere, o non agiscono affatto. Nell' alcool assoluto le spore dei bacilli mantengono anche per mesi la facoltà di germogliare, e lo stesso accade se sono tenute nella glicerina o nell'acqua.

Questo rapido sguardo sintetico, gettato così in breve sulle proprietà morfologiche e fisiologiche dei microrganismi, era necessario, perchè su queste appunto sono informati i metodi di ricerca e perchè lo studioso deve prima avere in mente tutti e singoli i problemi che sono da risolversi, allorquando si accinge a studiare una malattia da infezione. Non basta infatti, per risolvere un quesito di questo genere, la rivelazione d'una forma qualsiasi di microrganismi e la dimostrazione del potere patogenico della stessa; bisogna eziandio ricercare esattamente quali sono le condizioni di vita del parassita al difuori del-

l'organismo animale, vale a dire quali sono le sostanze nutritive più atte al suo sviluppo ed alla sua riproduzione col mezzo di spore, quali le circostanze di temperatura, umidità ecc., più adatte al compimento di quelle funzioni e quali invece in cui la vita si spegne; quali alterazioni il microbio produce sui mezzi stessi di nutrizione, quale è il suo modo di comportarsi verso i gaz e verso i varî agenti fisici e chimici: e così di seguito una serie di problemi dalla cui soluzione l'igiene aspetta di trarre quelle norme, che sono più adatte a difendere il nostro individuo da siffatti nemici, i quali sfuggono alla osservazione ordinaria e sono appunto perciò i più pericolosi.

CAPITOLO II

Stromenti necessari per le ricerche e loro disinfezione.

Il primo e il più importante di tutti gli stromenti per questo genere di ricerche è indubbiamente il *microscopio*. La costruzione di questo e il modo di usarne sono ormai così diffusi, che potrebbe sembrare superfluo a prima giunta il parlarne qui in modo speciale. Sono necessarie però per l'osservazione microscopica dei microrganismi alcune particolarità cui è necessario di accennare, perchè la loro applicazione segna uno dei progressi i più notevoli nella tecnica di questi studi, ed è inoltre indispensabile per tener lungi alcune cause d'errore.

Apparecchio d'illuminazione di Abbe.

La particolarità più interessante a questo riguardo è il modo di illuminare il preparato in cui si ricercano i microrganismi, giacchè per mezzo dell'illuminazione si possono rendere gli stessi più o meno visibili, e si può far risaltare la loro imagine a scapito di quella degli elementi che li circondano.

Quando in un preparato microscopico, prendiamo ad esempio una sezione di tessuto contenente microbi chiusa nel balsamo, sieno colorati questi ultimi ed i nuclei cellulari, l'imagine microscopica risulta composta non solo dalle parti anzidette co-

lorate, ma anche dagli altri elementi del tessuto, fasci di fibre, vasi, ecc., i quali non hanno lo stesso potere rifrangente del mezzo in cui stanno.

Questa apparenza è dovuta alla diffrazione che subiscono i raggi luminosi nello attraversare mezzi dotati di diverso potere di refrangenza, e si manifesta sotto forma di linee e di ombre, che costituiscono appunto la cosidetta *imagine microscopica*. Queste linee e queste ombre fanno sì che, se i microrganismi sono piccoli e sottili o sono in poca quantità, rimangono nascosti, e l'occhio dell'osservatore non giunge a scoprirne la presenza, oppure rimane incerto sulle particolarità degli stessi; se poi la sezione è un po' spessa, non appaiono neanche i microfiti più grossi.

Ad ovviare a questo inconveniente non basta adoperare un diaframma largo, il quale permette una maggiore illuminazione ed un minore risalto delle particolarità di struttura del preparato; è necessario aggiungere un apparecchio condensatore della luce, di breve distanza focale, il quale permetta di modificare anche di più il cono di raggi luminosi, in modo che questo sia di breve lunghezza ed acquisti in pari tempo una base molto larga e maggiore, in proporzione della minor lunghezza, di quella che si può ottenere col semplice specchio concavo. Con questo difatti l'oggetto viene illuminato da un fascio di raggi quasi paralleli, che passano attraverso il diaframma, mentre con un apparecchio condensatore si ha un intiero cono luminoso che va ad illuminare il preparato, posto in corrispondenza dell'apice del cono stesso.

In tal guisa si comprende facilmente che quanto è più grande l'angolo d'apertura del cono luminoso, altrettanto maggiore deve essere la quantità di luce che attraversa il preparato microscopico; quindi i fenomeni di diffrazione e le ombre degli elementi dei tessuti devono diminuire in grado corrispondente, e rimanere visibili soltanto quelle parti le quali, essendo colorate, assorbono la luce.

L'apparecchio d'illuminazione che meglio soddisfa a siffatte condizioni è finora quello di Abbe, giacchè fornisce un cono

illuminante con un angolo d'apertura di 60°, vale a dire con un'apertura totale di 120°. La distanza focale di questa combinazione di lenti è di pochi millimetri, talchè collocando l'apparecchio sul posto del porta-diaframmi, fra lo specchio e il tavolo del microscopio, un po' al disotto del livello di quest'ultimo, il punto focale va a cadere precisamente sull'oggetto da osservarsi, il quale viene posto così nelle condizioni d'illuminazione più favorevoli possibili. Fra lo specchio e le lenti, vicino al punto focale del primo, si trova un porta-diaframmi, sul quale si possono adattare singoli diaframmi di diversa larghezza; il porta-diaframmi può essere formato, come consiglia il Koch, da una lamina metallica che si fa scorrere lateralmente, provvista di un certo numero di fori, la cui larghezza varia da uno all'altro di un millimetro, in modo che con questi si possono facilmente ottenere tutte le gradazioni di luce che si desiderano.

Si può anche rendere più intensa l'illuminazione, ponendo fra la superficie inferiore del vetrino portoggetti e la parte superiore del condensatore una goccia d'acqua, o meglio ancora una goccia del liquido che serve per l'immersione degli obbiettivi, avendosi in tal guisa il cosidetto *condensatore a immersione.*

Se non si ha l'apparecchio di Abbe, si può adattare sul porta-diaframmi una lente semisferica, od anche porre una semplice goccia d'acqua sotto al vetrino portoggetti, sempre allo scopo di condensare la luce.

Se è necessario per le nostre ricerche un apparecchio condensatore e l'uso di larghi diaframmi, non si deve intendere con ciò che si debba in ogni caso eliminare l'imagine di struttura del preparato microscopico. Anzi non bisogna mai trascurare di esaminare i rapporti che acquistano i microparassiti colle varie parti del tessuto che li alberga, e si deve sempre far precedere all'osservazione dettagliata il cosidetto *sguardo d'insieme*, che io chiamerei meglio *osservazione sintetica del preparato*, la quale è indispensabile assolutamente per prendere cognizione del modo di ripartirsi degli stessi microrganismi.

Per la maggior parte delle ricerche non sono necessari ingran-

dimenti straordinari: sono sufficienti in generale gli ingrandimenti compresi fra i 100-700 diametri; quello minore di 100 diam. serve per l'osservazione sintetica, e gli altri maggiori per i dettagli relativi alla forma e alla grandezza dei microparassiti.

Immersione omogenea.

La seconda particolarità a cui voglio accennare è l'uso degli obbiettivi a immersione omogenea, che è quasi altrettanto indispensabile per questi studi che l'apparecchio d'illuminazione, specialmente quando si tratta di bacilli sottili e delicati, come sono ad esempio quelli della setticemia dei topi osservati dal Koch. A questo proposito accenneremo in breve quali sono i vantaggi principali, che offre per le nostre ricerche un tal genere di obbiettivi su quelli a secco ordinari. L'immersione delle lenti obbiettive in genere, della cui applicazione siamo debitori all'Amici, ha per iscopo anzitutto di eliminare, per quanto si può, gli effetti della refrazione che subiscono i raggi luminosi incidenti obliquamente, allorquando passano dalla superficie superiore del coproggetti nell'aria, e da questa di nuovo nella superficie inferiore della lente obbiettiva. La deviazione dei raggi periferici obliqui fa sì che non si riuniscano poi nello stesso punto di quelli centrali, concorrendo in tal guisa, insieme coll'aberrazione di sfericità della lente, ad alterare la chiarezza della imagine microscopica. La stessa deviazione è poi tanto maggiore, quanto più acuto è l'angolo d'incidenza dei raggi sulla superficie di passaggio, ossia quanto è più grande l'angolo d'apertura del sistema di lenti obbiettivo; quell'angolo cioè che viene formato dai raggi luminosi divergenti i quali, partendo dall'oggetto osservato (considerato come un punto), vanno alla periferia della lente accomodata alla distanza di osservazione netta. Ora l'angolo d'apertura degli obbiettivi è tanto maggiore, quanto minore è la distanza focale degli stessi, ossia quanto più forte è il loro potere d'ingrandimento; per cui negli obbiettivi a secco più forti l'imagine microscopica non può essere molto netta.

L'immersione semplice ad acqua toglie in parte questo inconveniente, perchè la differenza fra l'indice di refrazione del vetro e quello dell'acqua è minore di quella che esiste allo stesso riguardo fra il vetro e l'aria; non lo toglie però completamente, perchè l'indice di refrazione dell'acqua è minore di quello del vetro (crown), da cui sono formati la lente dell'obbiettivo e il coproggetti. Nei sistemi d'immersione ad acqua è sempre necessaria anche una vite di correzione, che serve ad aumentare o diminuire la distanza che esiste fra le varie lenti del sistema obbiettivo, a seconda dello spessore del coproggetti.

L'inconveniente viene tolto del tutto, se si usa invece dell'acqua un liquido d'immersione che abbia lo stesso esponente di refrazione del vetro (crown). Con tal mezzo si ha anche il vantaggio di eliminare l'influenza dello spessore del coproggetti e di poter fare a meno della vite di correzione, per quanto a questo riguardo non tutti i microscopisti sieno d'accordo. Questa cosa è stata anzi anche recentemente oggetto di discussione nella Società reale di microscopia a Londra, ed il Carpenter (1) dice che sarebbe preferibile che anche gli obbiettivi ad immersione omogenea fossero provvisti dell'apparecchio di correzione, giacchè la più piccola differenza dell'indice di refrazione del liquido d'immersione o del vetro coproggetti, il cambiamento dell'oculare, come anche il più piccolo cangiamento della lunghezza del tubo, in una parola qualsiasi circostanza, che tende a cambiare le condizioni nelle quali fu operata la correzione dell'obbiettivo, agisce in modo nocivo alla nettezza dell'imagine.

Tuttavia, siccome la correzione dell'obbiettivo è cosa incomoda da eseguirsi ogni volta, si preferiscono ordinariamente gli obbiettivi a immersione omogenea a correzione fissa, nell'uso dei quali bisogna aver sempre l'avvertenza di mantenere invariata quella lunghezza del tubo del microscopio, per la quale sono stati adattati (2).

---

(1) Journ. R. Microsc. Soc., ser. II, vol. IV, 1884, part. 4, p. 620.

(2) Per gli obbiettivi continentali questa lunghezza del tubo del micro-

Il liquido migliore per l'immersione omogenea è *l'olio etereo di legno cedrino* ad un certo grado di concentrazione, avente un indice di refrazione quasi eguale ed il potere di dispersione superiore di poco a quello del vetro (crown). Si può anche usare per lo stesso scopo il miscuglio di altri olii eterei fortemente rifrangenti, olio di garofani, di finocchio e di anici, coll'olio d'oliva o di ricino, oppure il miscuglio di glicerina e cloralio idrato, o la soluzione di ioduro di zinco nella glicerina pura, proposta dal Brun di Ginevra, i quali due ultimi liquidi si possono più facilmente togliere dal coproggetti.

Per adoperare questi obbiettivi, si pone una piccola goccia del liquido d'immersione sul vetrino coproggetti o sulla lente obbiettiva, oppure una goccia su questa e una su quello, il che riesce meglio di tutto giacchè si evita l'inconveniente, che si verifica talora ponendo la goccia soltanto sul vetrino, del rimanere una bollicina d'aria aderente alla superficie inferiore della lente obbiettiva, la quale si trova situata un po' più profondamente del cercine metallico che la circonda, per impedire i guasti possibili nel caso di urto dell'obbiettivo sul preparato.

I migliori obbiettivi ad immersione omogenea, che sono quelli costruiti dallo Zeiss di Jena, hanno anche il vantaggio di sopportare bene la combinazione cogli oculari più forti. — A lato di quelli dello Zeiss, ma in seconda linea, si possono mettere per bontà gli obbiettivi ad immersione omogenea di Seibert, di Winkel, di Hartnack e del nostro Koriska di Milano. La denominazione di $^1/_{12}$, $^1/_{18}$ ecc., che hanno tali obbiettivi, si riferisce alla loro distanza focale equivalente, espressa in frazione di pollice inglese ($^1/_{12}$ Zeiss corrisponde a 2 ^{mm} circa e $^1/_{18}$ a 1,3 ^{mm} di distanza focale).

Microtomi.

Un altro istromento, che è pure indispensabile per la tecnica dei microrganismi, per quanto esso pure sia tutt'altro che esclu-

---

scopio è di 15-17 Cm., misurati dal punto di unione dell'obbiettivo col tubo stesso.

sivo di queste ricerche, è il *microtomo*. Mi è parso opportuno il darne qui una descrizione particolare, perchè è mio intento di riunire in questo libro tutto quanto può occorrere allo studioso per simili ricerche, senza che questi senta il bisogno di ricorrere qua e là ad altri manuali; ed anche perchè vi sono nell'uso di questo prezioso stromento alcune speciali avvertenze per l'oggetto particolare di ricerca che ci riguarda.

Quando si voglia studiare la disposizione che hanno i microrganismi nell'interno degli organi, i rapporti che contraggono coi singoli elementi dei tessuti e la diffusione loro negli stessi, è necessario di poter avere sott'occhio una estensione di tessuto piuttosto grande ed uniforme, ed è necessario inoltre di ottenere serie successive e continue di sezioni, che permettano di seguire nello interno di un organo lo sviluppo e la diffusione degli stessi microbi. Orbene per tutto questo è indispensabile il microtomo. Un altro servizio importantissimo, che rende quest'istromento, è quello di facilitare l'esame degli organi freschi, congelati, giacchè il *coltello doppio*, che prima si adoperava a tale scopo, dà spesso sezioni lacerate e sempre grosse, e rovina per di più il pezzo anatomico.

Fig. 2 — Microtomo di Thoma.

I microtomi si distinguono in 2 categorie, *microtomi a vite* e *microtomi a slitta;* ma tanto dell'una come dell'altra specie esiste un gran numero di varietà, ed in questi ultimi tempi si sono fatte e si fanno ancora continue variazioni e migliorie agli stro-

menti primitivi. Quelli che per ora sono considerati i migliori, sono: quello di Schanze di Lipsia (*Pathol. Institut*), quello di Thoma fabbricato dallo Jung (*Heidelberg*), quello di Katsch di Monaco di Baviera, quello di Meier di Strasburgo, quello di Long di Breslau, ecc. Io mi limiterò a dare la descrizione dei primi due, i quali pare corrispondano all'uso meglio di tutti gli altri.

Il microtomo del Thoma (1), che è noto anche col nome di microtomo di Jung (Fig. 2), è un *microtomo a slitta*, fatto di ghisa massiccia, nella quale sono scavate due scanalature triangolari, parallele fra loro e divise da un piano di metallo piuttosto grosso; in uno dei solchi scivola a dolce sfregamento un grosso pezzo di ferro (M) conico, su cui si fissa il coltello, mentre l'altro è destinato a ricevere il pezzo portoggetti (O). Ciascuna di queste due slitte poggia sul solco corrispondente per mezzo di cinque punti, ossia scorre su cinque superficie larghe da 2-3 ^{mm}, il che permette una grande solidità, e al tempo stesso un facilissimo movimento delle slitte. Bisogna sempre badare a che la slitta, che porta il coltello, scivoli, ogni volta che si fa una sezione, su tutta quanta la superficie di scorrimento, e non su di una parte soltanto della stessa; e ciò per evitare che, dopo un certo tempo che si usa il microtomo, si abbiano disuguaglianze e salti nello scivolamento del coltello, per essersi consumata una parte della superficie di scorrimento più dell'altra. La lama del coltello è larga e pesante, ed il manico è ripiegato in modo che, quando questo si trova in posizione orizzontale, il tagliente della lama trovasi diretto alquanto all'ingiù. Il manico ha una larga fenditura destinata a ricevere la vite che serve a fissarlo. La scanalatura in cui scorre il pezzo portoggetti è dolcemente inclinata, e per effettuare lo scorrimento di questo, avvi un apparecchio a vite micrometrica portato da una terza slitta (S), la

---

(1) Thoma, *Ueber ein Microtom*. Virchow's Arch. Bd. 84, p. 189-191; e Journ. R. Microsc. Soc. London, ser. II, vol. III, 1883, p. 298-307.

quale si può fissare col mezzo di una grossa vite a pressione in un punto qualunque del microtomo. La punta della vite micrometrica poggia contro una laminetta liscia di agata, fissata all'estremità posteriore della slitta portoggetti. Alla metà della lunghezza di questa vite si trova un disco metallico, nella cui periferia sono incise 25 divisioni lineari, ciascuna delle quali girando corrisponde ad uno spessore di sezione di 0,001 ^{mm}. Questa vite micrometrica è stata ora anche perfezionata, giacchè il disco porta in luogo delle divisioni lineari altrettanti denti, su cui scatta una penna metallica; e così invece di dover leggere sulla scala lo spessore della sezione che si desidera, questo si viene a conoscere per mezzo del romore, il quale indica il numero di divisioni che ha percorso la vite. È questo un vantaggio utile specialmente allorquando si tratta di sezionare in serie, nel qual lavoro l'occhio è già abbastanza occupato. Se poi non si desidera una tale disposizione, non si ha che cangiare la posizione di una leva e la penna non scatta più.

È importante badare a che ogni singola parte, ma specialmente le superficie di scorrimento, sieno lubrificate col cosidetto *olio di ossa*, e sieno mantenute prive di polvere e di ruggine, se si vuole che lo scivolamento sia sempre uniforme e regolare.

Il microtomo costruito dal meccanico Schanze di Lipsia (Fig. 3) è una felice combinazione dei due sistemi a vite ed a slitta; il coltello viene mosso colla slitta, e l'oggetto invece si innalza per mezzo di una vite verticale. È preferibile il modello fabbricato in ghisa nichelata a quello fatto d'ottone, giacchè nel primo lo sfregamento è molto minore. Il disco (S) porta una larga ruota, sui margini della quale si trova una divisione in gradi che permette di leggere facilmente di quanto il disco si gira; ciascuna divisione corrisponde a un innalzamento dell'oggetto di $^{1}/_{100}$ ^{mm}. La testa della vite agisce anzitutto sulla lastra metallica P, la quale porta la morsa in cui si fissa l'oggetto da sezionare. Due assi metallici, disposti ad angolo retto e provvisti ciascuno di una vite a pressione, servono a piegare la morsa portoggetti in qualunque direzione, mentre un terzo braccio la fa girare attorno

al proprio asse e permette di innalzarla perpendicolarmente. L'innalzamento dell' oggetto non si compie adunque per azione diretta della vite: la qual cosa, se nuoce un poco all'esattezza ed alla regolarità dell' elevazione, ha d' altronde il vantaggio che l'alcool con cui si bagna il coltello non isgocciola sulla vite e non ne disturba il movimento. La morsa è composta di due

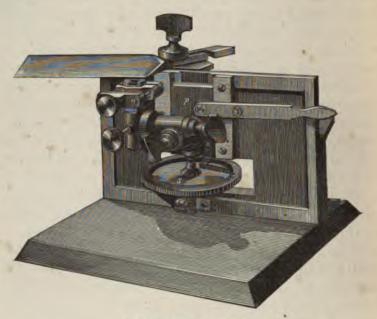



Fig. 3 — Microtomo di Schanze.

branche parallele, che si avvicinano per mezzo di un'altra vite. Per fare sgocciolare l'alcool sul coltello, senza aver bisogno di doverlo bagnare ogni volta con un pennello, e per avere libere le mani, si adatta con un sostegno sopra il coltello una bottiglia di vetro, munita di un robinetto capillare che lasci cadere l'alcool a goccia a goccia.

Un altro apparecchio accessorio del microtomo, e da raccomandarsi specialmente per sezionare i pezzi inclusi in paraffina, è quello destinato ad impedire l'accartocciarsi delle sezioni

(*Schnittstrecker*), il quale si adatta sulla lama del coltello, come si vede nel disegno del microtomo di Thoma, ed è di varia forma secondo i fabbricanti.

Fra le tante modificazioni proposte a questi microtomi, una abbastanza importante per la pratica delle sezioni in serie è quella dei microtomi cosidetti *automatici*. Il modello migliore di siffatti stromenti è finora quello costruito di recente dal Reichert di Vienna (Fig. 4), fatto in guisa che l'oggetto da sezio-

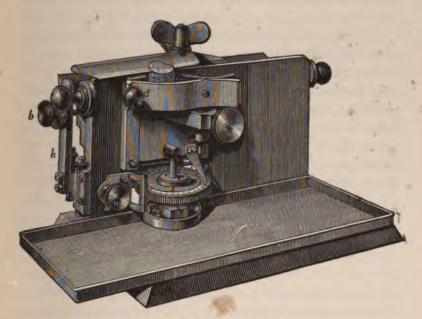



Fig. 4 — Microtomo automatico di Reichert.

nare si eleva automaticamente nel modo che segue. La slitta che porta il coltello va ad urtare nella parte anteriore, ogni volta che si spinge in avanti dopo aver fatto una sezione, in una leva *h*, il cui braccio orizzontale (non visibile nella figura perchè situato posteriormente) si incastra nella ruota dentata *Z* e la fa girare di uno o più denti. Appena cessa la pressione della slitta sulla leva, ossia appena il coltello comincia a tagliare, la spirale me-

tallica *s* tira indietro il braccio di leva dalla ruota dentata, e lo rimette in posizione per la sezione successiva. La misura del giro della ruota dipende dalla grandezza della spinta ricevuta dalla leva per l'urto del coltello, e questa viene regolata per mezzo della vite *b* colla madrevite *c*. L'apparecchio è fatto in modo che il massimo, di che la leva può far girare la ruota ad ogni singolo urto del coltello, è di 10 denti, e questo massimo può essere ridotto, girando la vite *b*, di quanto si vuole, fino anche a far muovere la ruota di un sol dente ad ogni singolo urto.

La parte inferiore (non visibile nella figura) dell'asse verticale della ruota dentata è foggiato a vite; ad ogni passo di questa, corrispondente ad un intiero giro della ruota, si ottiene un'elevazione di 0,75 ^{mm}, e siccome sulla parte superiore dello stesso asse, foggiata a punta, riposa il portoggetti, questo viene naturalmente elevato di ugual misura. Alla periferia della ruota sono incisi 100 denti, cosicchè ad ogni dente che gira corrisponde un'elevazione di 0,0075 ^{mm}, che è poi il limite superiore di sottigliezza delle sezioni che si può ottenere col microtomo automatico. Questo limite di sottigliezza, quasi teorico, non è del resto mai necessario per la pratica, e non si potrebbe neanche ottenere, giacchè sullo spessore delle sezioni influisce non solo l'innalzamento dell'oggetto, ma anche il grado di consistenza dello stesso e la finezza del taglio del coltello. Coi pezzi meglio induriti si possono ottenere sezioni di 0,004 — 0,006 ^{mm} di spessore, ossia un tal grado di finezza da soddisfare a qualsiasi esigenza. Il limite inferiore è, come ho detto, di $^1/_{10}$ di giro della ruota, ossia di 0,075 ^{mm} di spessore delle sezioni. Se si vuole uno spessore maggiore, non si ha che togliere l'apparecchio automatico, ossia svitare la vite *a* e togliere la spirale *s;* si gira allora la ruota colla mano, e si legge per mezzo dell'indice *g* sulla divisione che trovasi alla periferia della ruota stessa il grado di inalzamento; oppure si ascolta col rumore che fanno i denti nello scattare il numero di divisioni percorse, e quindi il grado di elevazione dell'oggetto.

In tutti questi microtomi si può nel luogo della morsa portoggetti adattare una *piastra metallica*, oppure una *cassetta* per la *congelazione* dei pezzi freschi; e con quest'apparecchio, utilissimo e indispensabile anzi per le ricerche microparassitologiche, si è in grado di ottenere sezioni di organi freschi, colorate e rinchiuse, in un quarto d'ora appena dopo la necroscopia. La superficie inferiore della piastra, o cassetta che sia, viene colpita da un getto di etere, ridotto in polvere per mezzo di un polverizzatore ordinario, ed il pezzo anatomico che sta sulla superficie superiore si congela in pochi istanti. Si possono allora ottenere sezioni di qualunque spessore, come da un pezzo che sia stato già indurito, e solo è da avvertire di immergere lentamente nell'alcool le sezioni ottenute in tal modo, per impedire che si accartoccino, e di lasciarvele prima di colorarle, fino a che si sono svolte tutte le bollicine d'aria che si formano per l'atto del congelamento e successivo disgelo dei tessuti.

Qualunque sia il microtomo che si adopera, lo spessore dei tagli dipende, oltre che dal grado di consistenza del tessuto, specialmente dalla finezza del tagliente del coltello, il quale sfortunatamente per la sua forma speciale è poco adatto ad esser affilato sulla pietra da rasoi. Bisogna ben guardarsi dal dare ad affilare agli arruotini ordinari uno di questi coltelli, e bisogna invece esercitarsi ad affilarlo da noi stessi. A tal uopo si prende una pietra bastantemente lunga e larga, e la si spalma di un miscuglio di glicerina e di alcool, le cui proporzioni dovrebbero variare secondo la qualità della pietra, ma che in generale possono essere di 2 parti di glicerina ed 1 di alcool. Si poggia a piatto sulla pietra la lama del coltello nella sua parte più vicina al manico, e quindi si fa strisciare *col tagliente rivolto all' innanzi, lentamente* e *senza premere*, ma soltanto per forza d'adesione, in modo che si giunga alla fine della pietra coll' estremità libera del coltello stesso. Si volta allora la lama sul dorso, e si torna indietro strisciando sulla pietra colle stesse avvertenze, per far ritorno nella posizione primitiva. Nel far ciò bisogna badare di non alzar mai dalla pietra il dorso del coltello, e di non eserci-

tare mai pressione di sorta, lasciando che il coltello stesso strisci per la semplice forza di adesione molecolare. Dopo 15-20 volte che si è ripetuta questa manovra, si prova delicatamente sulla pelle della palma della mano distesa, se si è raggiunto il grado necessario di acutezza del tagliente, e quindi si adatta sulla slitta. Si può anche usare egualmente, per affilare i coltelli, la cote di cuoio su cui si trova distesa la pasta collo smeriglio.

Anche nel fissare il coltello sul microtomo bisogna avere alcune avvertenze. Il coltello deve essere situato in modo, che *cominci ad agire sul pezzo da sezionare col principio del tagliente* e non urti in quello colla parte smussa, nè cominci a tagliare col mezzo della lama. La seconda avvertenza è che, quando si è posto in sito l'oggetto, si deve ad ogni volta provare quale è l'angolo più favorevole che deve fare con quello il coltello perchè la lama, corrispondentemente alla larghezza del preparato, *venga utilizzata in tutta la sua lunghezza.*

Per quel che riguarda la fissazione del pezzo anatomico sulla morsa portoggetti, questa anzitutto può essere di varia forma e grandezza, ed è anzi necessario averne più di una di ricambio. In generale sono preferibili quelle morse che sono costituite da due branche parallele, avvicinabili fra di loro, e che si possano muovere e girare in qualunque direzione, in modo da poter situare l'oggetto nella posizione più conveniente, tanto a riguardo del punto della lama che deve incominciare il taglio, come riguardo al piano di sezione del coltello stesso. In ogni caso il preparato deve essere situato ben fisso sulla morsa, e per far ciò lo si attacca colla soluzione di gomma, o colla cosidetta côlla liquida sopra un pezzo di sughero tagliato ben liscio; oppure si mette colla gomma fra due pezzi di midollo di sambuco, o di fegato amiloideo, o di cervello induriti nell'alcool, e quindi si immerge in questo liquido, il quale indurisce la gomma e fa sì che il preparato (che deve essere non molto grande) aderisca sicuramente al materiale che serve a fissarlo. Condizione essenziale per avere buone sezioni è che il pezzo sia bene indurito. Si può anche senz'altro porlo direttamente fra due lamine di

fegato nella morsa, e quivi fissarlo colla vite in modo che sporga da quella di 1-2 ^{mm}.

Nella maggior parte dei casi, specialmente se il preparato è bene indurito, si è in grado di fissarlo coi mezzi suesposti in modo da ottenerne senz'altro sezioni complete ed uniformi. In certi altri però, quando la superficie dell'oggetto è irregolare e si vogliono ottenere sezioni anche della superficie stessa, la si rende eguale coprendola di uno strato sottile di mucillagine di gomma, ponendovi su una lamina di fegato indurito e immergendo finalmente il tutto nell'alcool, per fare aderire il fegato alla superficie del preparato. Bisogna badare a che la gomma nell'alcool non divenga troppo dura e danneggi quindi il tagliente del coltello. Il Bizzozero ha trovato che per ottenere un indurimento giusto di quella sostanza, è adatto un alcool che abbia un peso specifico di 875.

Si può anche usare con vantaggio il miscuglio di glicerina e gelatina proposto dal Klebs. Si fanno rigonfiare nell'acqua 10 gr. di gelatina purissima, si decanta l'eccesso di acqua, si fa sciogliere la côlla a moderato calore e vi si aggiungono 10 gr. di glicerina con qualche goccia di soluzione di acido fenico per conservarla. Questa miscela alla temperatura ordinaria è solida; volendosene servire per lo scopo anzidetto si liquefa, se ne versa un poco sulla superficie del preparato fino a coprirne le disuguaglianze, si fa raffreddare e si tiene nell'alcool, fino che ha acquistato consistenza sufficiente per farne sezioni.

Finalmente vi sono alcuni oggetti i quali o contengono cavità molto grosse (embrioni), oppure hanno un contenuto d'acqua troppo forte, o sono troppo grandi per acquistare coi mezzi ordinari un indurimento sufficiente per essere tagliati in lamelle sottili: ed allora si ricorre ad un altro spediente, alla cosidetta *inclusione* (Einbettung) in mezzo a sostanze, le quali nello stato liquido penetrano non soltanto nei grossi spazii vuoti, ma anche nell'interno del tessuto stesso, e quindi solidificandosi per opera del semplice raffreddamento, o per l'azione dell'alcool, impartiscono al preparato un grado tale di omogeneità e di consistenza, che lo rende atto ad essere sezionato.

Le sostanze che si possono adoperare per l'inclusione dei preparati sono assai diverse; qui però dobbiamo limitarci ad accennare soltanto a quelle che offrono maggiori vantaggi, anche avuto riguardo allo scopo nostro speciale della ricerca dei microrganismi nei tessuti. Queste sostanze sono la *paraffina* e la *celloidina*.

Inclusione in paraffina.

I pezzi, precedentemente induriti nell'alcool assoluto e completamente disidratati, si immergono anzitutto nel cloroformio, oppure negli olii essenziali diluiti coll'alcool in vario grado. Siccome pare, per quanto non si sappia ancora in qual misura, che il cloroformio tolga a certi microbi la proprietà di combinarsi coi colori d'anilina, si può usare pel nostro intento l'olio di trementina, o l'olio di bergamotto, o il petrolio. Il Francotte (1) consiglia di diluire questi olii nelle proporzioni seguenti:

1	vol.	olio di	trementina	e	2	vol.	alcool
1	»		»		1	»	»
2	»		»		1	»	»

Si tiene immerso il preparato in ciascuno di questi tre miscugli successivamente per qualche ora, e quindi si pone in una soluzione satura di paraffina nell' olio di trementina, riscaldata nel bagno maria a 50° C. Dopo qualche tempo si immerge nella paraffina pura, liquefatta a bagno maria, la quale va a sostituire l'olio etereo nell'interno dei tessuti, in un tempo variabile da 1 a 12 ore, secondo la grandezza e secondo la qualità dell'oggetto. Quest'ultima operazione deve essere compiuta in uno speciale apparecchio o cassetta riscaldata a temperatura costante, che deve essere regolata fra 45-50° C. Siccome vi sono varie specie di paraffina, che hanno un punto di fusione diverso, così se ne dovrà scegliere una che si mantenga liquida alla temperatura

(1) Francotte, *Microtomes et méthodes d'inclusion* Bull. Soc. belge de Microsc., t. X, 1883-84, N° 3, p. 55.

anzidetta, nello intento di evitare che una temperatura più elevata alteri la tessitura del pezzo che si rinchiude. In generale si deve scegliere una paraffina che sia semitrasparente, che si rompa facilmente, ed il cui punto di fusione stia fra 45-50° C.

Di questi apparecchi per la chiusura in paraffina ve ne sono di varii modelli; come uno dei più comodi e dei più usati posso designare quello adoperato dal Mayer nella stazione zoologica di Napoli.

Una volta compiuta l'operazione, si prende un pezzo di sughero, si circonda di carta in modo che questa formi al disopra del sughero stesso una specie di cassetta circolare, si fissa la carta al sughero con una punta metallica, e vi si versa la paraffina liquida, nella quale si adatta poi l'oggetto da sezionare nel modo più conveniente; si ricuopre con un nuovo strato di paraffina e si lascia raffreddare. Se il pezzo è grosso, si fa la stessa operazione entro una scatoletta di carta quadrangolare.

Il metodo finora descritto è uno dei tanti che si sono proposti per fare l'inclusione in paraffina, giacchè esiste un numero grandissimo di modificazioni, la maggior parte delle quali hanno avuto piuttosto per risultato di complicare un processo che non offre in sè alcuna difficoltà, ed è assai comodo. Molto più spiccio, e altrettanto sicuro, è il metodo seguente del Giesbrecht modificato dal Vogt. I pezzi induriti nell'alcool assoluto si immergono direttamente nel cloroformio, ove in principio galleggiano; vi si versa sopra a poco a poco una certa quantità di alcool, fino a che ricuopre il preparato, il quale si lascia lì fra i due liquidi, finchè sia compiuta la miscela degli stessi e il pezzo sia caduto al fondo del vaso. Questo accade in un tempo che varia secondo la grandezza e secondo la natura del tessuto, ma che in generale non sorpassa le 12 ore. A questo punto il preparato è già completamente imbevuto di cloroformio, ed è pronto perciò per esser messo in paraffina.

Il Giesbrecht consiglia di immergerlo prima in una soluzione concentrata di paraffina nel cloroformio, riscaldata a bagno maria. Si può però fare a meno di questa parte dell'o-

perazione, e portare direttamente il pezzo dal cloroformio nella paraffina liquefatta alla temperatura di 45-50° C. In questa si lascia per mezz'ora, o poco più, e quindi si estrae e si fissa senz'altro sul piatto del microtomo (quello che serve per la congelazione) con una goccia di paraffina.

Le sezioni dei pezzi inclusi in paraffina si fanno senza bagnare il coltello coll'alcool.

La parte più tediosa forse di questo processo è il trattamento successivo che devono subire le sezioni prima d'essere colorate. Appena queste si sono tagliate, impedendone l'accartocciamento per mezzo dell'istromento apposito adattato sul coltello (Schnittstrecker), si portano nell'olio di trementina, in cui divengono presto trasparenti, sciogliendo la trementina in pochi minuti la paraffina di cui sono impregnate. Da qui si passano nell'alcool assoluto che si sostituisce alla trementina; dall'alcool assoluto si portano nell'alcool ordinario e da questo nell'acqua, donde, dopo averle ben lavate agitando, si portano di nuovo nell'alcool assoluto per poi colorirle coi metodi ordinari. Non bisogna dimenticare quest'ultimo momento dell'operazione, poichè è indispensabile, per la buona riuscita della colorazione, che le sezioni passino direttamente dall'alcool assoluto nel liquido colorante.

L'inclusione in paraffina è quella che permette di fare le sezioni più sottili, ed in serie regolari, di qualsivoglia organo e tessuto, anche se questo è formato da parti discontinue. Il processo è inoltre così semplice, che riesce dopo poche prove anche per mano dei poco esperti, cosicchè in breve tempo è addivenuto il più diffuso e il preferito da tutti. A lato di questi vantaggi però avvi anche l'inconveniente della temperatura elevata a cui si devono assoggettare gli oggetti per un certo tempo, il che talora rende duri e friabili i tessuti e fors'anco li altera, diminuendo in pari tempo l'affinità di certi microparassiti pei colori d'anilina.

Inclusione in celloidina.

È questo forse il metodo più confaciente pel nostro genere di ricerche, giacchè non richiede una temperatura elevata ed è

più semplice il trattamento successivo che devono subire le sezioni prima d'essere colorate.

La prima idea di questo processo è dovuta a Latteux (1), il quale incluse i capelli nel collodion per farne sezioni. In seguito il Duval (2) ha usato l'inclusione nel collodion dei pezzi induriti nell'alcool e trattati quindi coll'etere. Ma il metodo acquistò diffusione dopo che Schiefferdecker (3) ha usato, invece del collodion preparato per l'uso fotografico, la *celloidina*, sostanza simile al collodion, che è posta in commercio sotto forma di lamine solide (4).

La celloidina si scioglie in una miscela a parti eguali di etere e di alcool assoluto. Lo Schiefferdecker consiglia di prepararne due soluzioni, una di consistenza sciropposa e l'altra più tenue, e di immergere gli oggetti prima nella soluzione tenue e quindi in quella più densa, tenendoli anche precedentemente immersi nell'etere, se sono difficilmente permeabili. Più semplice però è di tenere immerso il preparato, ben disidradato in precedenza nell'alcool assoluto, in una soluzione di celloidina a consistenza sciropposa, per un tempo variabile secondo la grandezza e secondo la natura del tessuto. In generale è da consigliare di fare pezzi piccoli, e di lasciarveli per 24-48 ore. Si prepara quindi una cassetta di carta attorno a un pezzo di sughero, nella maniera esposta per l'inclusione in paraffina, e vi si versa dentro la celloidina ed il preparato, disponendolo nella posizione che si desidera. Si lascia evaporare un poco, e quando si è formata alla superficie una pellicola solida di celloidina, si pone

(1) Latteux, *Manuel de technique microscopique*, I, p. 236.

(2) Duval, *Sur l'emploi du collodion humide pour la pratique des coupes microscopiques*, Journ. de l'Anat. et de la Physiol. t. XV, 1879, pag. 185.

(3) Schiefferdecker, *Ueber die Verwendung des Celloidines in der mikroskopischen Technik*, Arch. f. Anat. und Phys., I Abth. 1882, p. 199.

(4) La celloidina si può ora acquistare dagli stessi fabbricanti o rivenditori tedeschi, indicati per le materie coloranti.

nell'alcool a 70-80 %, avvertendo di attaccare al sughero un pezzo di metallo perchè stia sommerso. La celloidina dopo 24-48 ore di soggiorno nell'alcool ha già acquistato la consistenza necessaria per farne sezioni, ed i pezzi si possono conservare nel liquido suddetto anche lungamente.

Si può anche porre semplicemente il pezzo imbevuto di celloidina nell'alcool, e quando sia indurito, fissarlo sul piatto del microtomo con una goccia di paraffina o colla celloidina stessa.

Per fare le sezioni dei pezzi così preparati, si bagna il coltello coll'alcool ordinario e quindi, se si vuol togliere la celloidina dai tessuti, si pongono le sezioni stesse nel miscuglio di alcool e di etere a parti eguali e da qui nell'alcool assoluto per poi colorirle. Volendo ottenere la colorazione dei microrganismi è necessario fare quest'ultima operazione, giacchè la celloidina si colora abbastanza intensamente coi colori d'anilina, mentre invece si colora poco o niente col carminio e coll'ematossilina. Ma quando si vuol fare la colorazione con queste due ultime sostanze, basta mettere le sezioni nell'alcool e nell'acqua, e rischiararle infine coll'olio di bergamotto, o d'origano, o di legno di cedro.

Anche l'olio di garofani scioglie la celloidina, sicchè si consiglia dagli autori di adoperare altri olii essenziali, invece di questo, per rischiarare la sezione dei pezzi inclusi in celloidina. Io ho provato però a colorire i tessuti imbevuti di celloidina coi colori d'anilina, come d'ordinario, ed a trattarli poi coll'olio di garofani, precisamente nell'intento di fare sciogliere la celloidina stessa, senza bisogno di immergere prima le sezioni nel miscuglio di alcool e di etere. Ne ho difatti ottenuto preparati bellissimi e privi di quella sostanza, ma ho anche osservato che certe specie di microparassiti non si colorivano più che pochissimo, dopo l'inclusione in celloidina.

Piccoli stromenti.

Per quel che riguarda gli altri stromenti necessari per la manualità di queste ricerche, una parte degli stessi sono comuni alle

ordinarie manipolazioni istologiche; tali, ad es., gli aghi, le spatole, le forbici, le pinze, i vetri da orologio, le capsule di vetro e di porcellana, e così via. Sonvene però alcuni speciali, destinati in parte alla ricerca dei microbi nell'aria, nell'acqua e nel terreno, ed in parte alla sterilizzazione degli stromenti ed alla preparazione dei materiali nutritivi.

È necessario anzitutto tenere una busta speciale di stromenti per le necroscopie degli animali sui quali si sono praticati gli innesti, stromenti che si è spesso costretti di rinnovare in causa del deterioramento inevitabile che subiscono nell' essere arroventati ogni volta che si adoperano.

Apparecchi per la preparazione delle sostanze nutritive e per le culture.

Degli apparecchi speciali che si adoperano per lo studio dei microparassiti, alcuni servono per isterilizzare gli stromenti, altri per la preparazione delle sostanze nutritive e per la sterilizzazione delle stesse, ed altri infine, detti *stufe* o *termostati*, servono per le coltivazioni artificiali dei microbi fuori dell'organismo, le quali debbono essere mantenute a un moderato grado di calore costante. Finalmente ve ne ha pure di quelli destinati alle ricerche speciali dei germi contenuti nell'aria, nell'acqua e nel terreno; ma di questi credo più conveniente fare la descrizione parlando dei relativi metodi di ricerca, specialmente per evitare inutili ripetizioni.

Debbo premettere anzitutto che questi apparecchi, introdotti per la maggior parte dal Koch pel suo metodo speciale di ricerca, non sono tutti assolutamente indispensabili; dirò anzi che oggidì, volendo porre questi metodi alla portata di tutti e specialmente dei medici pratici, i quali nei villaggi non possono avere i mezzi e le comodità di un gabinetto sperimentale, si cerca di ridurre l'uso di stromenti speciali al minimo possibile, sostituendone alcuni con oggetti che si possono facilmente avere fra mano,

e facendo la disinfezione degli oggetti nel modo più semplice, ossia col calore diretto d'una fiamma a spirito od a gaz. Tuttavia è a dirsi che, quando le ricerche devono avere una durata transitoria ed uno scopo semplicemente diagnostico, come quando ad es. si tratta di fare la diagnosi d'un primo caso di colèra, possono anche le manipolazioni venire semplificate, ed essere tolta così la necessità di ricorrere a certi stromenti; ma allorquando si voglia intraprendere uno studio esatto, metodico e necessariamente continuato per un certo tempo, trattandosi di ricerche in cui si è circondati da cause d'errore innumerevoli, sarà bene di munirsi di tutto il necessario, che permetta di condurre i lavori con quel rigore scientifico che è la base indispensabile di qualsiasi studio serio.

Per isterilizzare nell'aria secca a 150-160° C. gli oggetti di vetro ed alcuni stromenti metallici serve la cosidetta *stufa sterilizzatrice* a *doppia parete* (Doppelwandige Sterilisirungskasten del Koch), che può essere fatta tanto di lamiera di ferro, come di rame. Il modello ultimo, ed il meglio costrutto per lo scopo a cui deve servire, è quello rappresentato dalla fig. 5, quale è stato ultimamente costruito dal Rohrbeck di Berlino in modo speciale, per ottenere nell'interno dell'apparecchio un riscaldamento uniforme. La cassetta a doppia parete, provvista dei tubi necessari a portare il termometro ed il termoregolatore, viene chiusa ermeticamente da una porta parimenti a parete doppia munita di fori, i quali corrispondono, quando si chiude, con quelli che esistono nelle pareti della cassetta, e permettono così la circolazione libera dell'aria in tutto lo spazio interparietale. Nella parte inferiore av-

Fig. 5.

una specie di anticamera di riscaldamento, formata da due parti sovrapposte; nella parte inferiore di questa l'aria si riscalda in contatto del fondo, sotto il quale arde la fiamma del gaz, per passare quindi attraverso la parte superiore forata e andare nello spazio interno. La parete esterna della cassetta ha poi nella parte inferiore un largo foro, attraverso il quale passa la fiamma per andar a toccare il fondo della camera di riscaldamento, mentre nella parte superiore è munita di una serie di fori, sui quali scorre una lamina con altrettanti buchi corrispondenti, destinati a regolare la velocità della circolazione dell'aria contenuta nello spazio interparietale. Quando l'apparecchio è in azione, l'aria riscaldata nell'anticamera passa nello spazio interno, ove sono contenuti gli oggetti da disinfettare, e da qui per le aperture superiori nello spazio interparietale. Nell'interno della stufa sonvi due o più lastre di ferro amovibili, provviste di fori, destinate a portare i piccoli oggetti da sterilizzare.

L'altezza e la larghezza di questa stufa variano secondo il bisogno. Le pareti possono essere rivestite di feltro o di asbesto. I tubetti da saggio lavati e chiusi con ovatta, come in appresso, si pongono nei cestini fatti di rete di fil di ferro zincato, e si fanno riscaldare per 1-2 ore a 150-160° C., non calcolando il tempo necessario al riscaldamento. Le capsule di vetro, le bottigliette coniche, ecc. si pongono direttamente sul fondo della cassetta o sulle lastre forate, oppure si mettono tutte entro un grosso recipiente di vetro ben pulito e chiuso con ovatta, per conservarle pure anche dopo di averle sterilizzate, fino a quando si adoperano. Gli oggetti di gomma, tappi e tubi, ed i liquidi o le sostanze in genere che servono da substrato materiale per le culture, e che si alterano a temperature elevate, devono essere sterilizzati nella corrente di vapor d'acqua a 100°, il quale dalle ricerche di Koch, Gaffky e Löffler(1) è stato provato così efficace nella pratica delle disinfezioni.

---

(1) Koch, Gaffky u. Löffler, *Versuche über die Verwerthbarkeit heisser Wasserdämpfe zu Desinfectionszwecken.* Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Bd. I, p. 322, 1881.

A questo scopo serve l'apparecchio rappresentato dalla Fig. 6, il cosidetto *apparecchio sterilizzatore a vapore* (Dampf-Sterilisirungsapparat del Koch). Questo consiste essenzialmente in un bagno d'acqua, a fondo largo perchè offra una grande superficie di riscaldamento, sopra il quale sta unito un cilindro di lamiera di zinco, rivestito di feltro o di asbesto per impedire la dispersione del calore. In fondo a questo cilindro, al disopra del bagno d'acqua, è situata una graticcia di latta destinata a sostenere le cestine coi tubi d'assaggio, o il recipiente per cuocere le patate, o qualsiasi altro oggetto che si voglia sottoporre all'azione del vapore a 100° C. Il coperchio è provvisto di un tubo pel termometro, il quale è infisso in un sughero che ha un altro foro per l'escita del vapore acqueo. Bagno e cilindro riposano su di un treppiede di ferro, circondato da un mantello metallico che impedisce la dispersione del calore e serve a diminuire il consumo del gaz.

Fig. 6 — Sterilizzatore a vapore.

Per adoperarlo si riempie di acqua fino ai 3/4 circa la parte dell'apparecchio situata al disotto della graticcia di latta (il livello dell'acqua è indicato dal tubo di vetro esterno), si riscalda con una fiamma di gaz, e quando il vapore che ne esce ha raggiunto i 100°, allora vi si colloca dentro un recipiente apposito, con fondo fatto a graticcia, nel quale si son posti i tubetti, o le bottiglie contenenti le sostanze di nutrizione da sterilizzare, oppure le patate da cuocere.

Se questo apparecchio è grande, e se si vuole che il vapor d'acqua raggiunga realmente i 100° C., si aggiunge all'acqua una certa quantità di sale di cucina.

Per cuocere e sterilizzare le patate, e per ottenere la sterilizzazione della maggior parte delle soluzioni nutritive, basta lasciare agire il vapor d'acqua a 100° C. per 3/4 d'ora a 1 ora, sempre calcolando il tempo dal momento in cui il termometro segna la temperatura suddetta, oppure, senza bisogno di osservare il termometro, dal momento in cui si vede il vapore acqueo escire in gran copia dal foro del sughero e dai contorni del coperchio. Per collocare nell'apparecchio e per tirar fuori comodamente il recipiente che vi è dentro, si lega il manico di cui è provvisto con una funicella che si avvolge all'estremità superiore del cilindro, fissandola su appositi uncini (V. Fig.).

Per isterilizzare il siero del sangue, che è il mezzo di nutrizione più adatto pei microrganismi patogeni, e che d'altronde

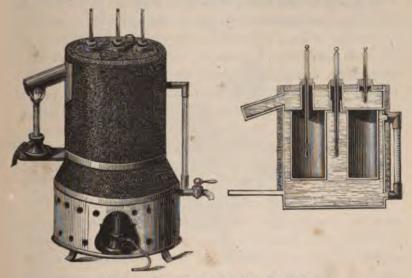



Fig. 7 — Apparecchio per la sterilizzazione del siero.

non potrebbe essere sterilizzato nella corrente di vapor d'acqua, perchè al disopra di 65-70° C. divien solido e a temperature anche superiori si intorbida, il Koch ha fatto costruire un altro apparecchio (Blutserumsterilisirungsapparat), di cui si vede la figura qui disegnata (Fig. 7). Anche questo consta essenzialmente d'un

cilindro a parete doppia rivestita di feltro, chiuso da ogni parte. Nella sezione verticale si vede che dal centro del fondo si eleva un tubo, che serve a mettere l'acqua nello spazio interparietale del cilindro, il quale si riempie fino alla metà circa dell'altezza. Lateralmente e in alto trovansi alcuni fori, destinati a dar esito a quel po' di vapore che si svolge durante il riscaldamento dell'apparecchio.

Il cilindro è munito d'un coperchio, pure a doppia parete, il quale ha lateralmente un tubo corto la cui cavità comunica collo spazio interparietale del coperchio stesso, e serve a riscaldare, mercè di apposita fiamma, l'acqua che vi è contenuta. L'acqua che si trova nello spazio interparietale del cilindro viene riscaldata da una seconda fiamma, situata sotto al cilindro stesso e circondata da una specie di mantello metallico, come nell'apparecchio di sterilizzazione a vapore. Nel coperchio vi sono tre fori: quello mediano è destinato a ricevere il tubo che si eleva dal fondo del cilindro, e porta un termometro che misura la temperatura dell'acqua contenuta fra le due pareti di quello; uno dei tubi laterali comunica coll'interno della doppia parete del coperchio, ed anche questo è destinato a portare un termometro che indica la temperatura dell'acqua quivi contenuta; il terzo finalmente attraversa tutto il coperchio, e porta un terzo termometro per osservare la temperatura dell'interno del cilindro.

Per mettere in azione l'apparecchio, si riscalda prima a 60° colle due fiamme situate come sopra e si collocano quindi entro il cilindro i tubi contenenti il siero da sterilizzare, mantenendo costante per 2-3 ore la temperatura dello spazio interno a circa 58° C., e ripetendo la operazione per sei ad otto giorni consecutivi. La temperatura costante di 58° deve essere raggiunta dal siero rapidamente, e si consiglia per ciò di porre a sterilizzare non molti tubi in una volta. Perchè il siero non solidifichi, ciascuna operazione non deve durare più di 3-4 ore, e la temperatura non deve superare mai i 60° C. Questo processo, cosidetto *di sterilizzazione discontinua*, proposto per la prima volta dal

Tyndall per i liquidi che si alterano o che coagulano alla temperatura dell'acqua bollente (infuso di fieno), è basato sul fatto che i microrganismi viventi alla temperatura in cui l'albumina coagula, ed anzi a temperature anche inferiori, muoiono, mentre le spore con questo grado di calore non vengono uccise ma germogliano. Si comprende così come ripetendo l'operazione per parecchi giorni consecutivi si uccidono a mano a mano i microbi che si sviluppano dai germi, finchè si giunge ad ottenere quella certa sostanza priva di qualsiasi impurità.

Il siero così sterilizzato, se si vuol conservare, è bene lasciarlo liquido, poichè anche se perde un po' d'acqua per evaporazione, non si altera per nulla nelle sue proprietà. Quando però si voglia solidificare, per avere un terreno di nutrizione solido e trasparente, s'adopera un apparecchio speciale parimenti ideato dal Koch, e che è rappresentato dalla Fig. 8. Questo apparecchio

Fig. 8. — Apparecchio per la solidificazione del siero.

è composto da una cassetta metallica a doppia parete, riempita d'acqua e rivestita come al solito di feltro. Nella parte superiore della doppia parete vi sono due tubi; uno serve per versare l'acqua nello spazio interparietale, e l'altro per portare un termometro che misuri la temperatura dell'acqua. Il coperchio è fatto di

vetro per poter osservare i tubi che vi son dentro. Accanto a questi si pone entro la cassetta un altro termometro, per misurare la temperatura dell'aria che vi si contiene. Per ottenere che il siero di sangue abbia una superficie estesa, più adatta cioè per lo accrescimento dei microparassiti e per potervi praticare coll'ago di platino gli innesti a strie, nell'intento di far crescere i germi separati l'uno dall'altro, i due piedi anteriori della cassetta possono venir accorciati a piacimento, per dare a questa e ai tubi che vi son dentro una posizione obliqua. È evidente allora che il siero del sangue si disporrà entro i tubi obliquamente, e quando si è solidificato, la superficie libera sarà grande più o meno a seconda della maggiore o minore inclinazione dei tubi stessi. In generale si tiene la cassetta in posizione talmente obliqua, che il siero giunga fino al terzo superiore del tubo, senza però che arrivi a toccare il cotone che lo chiude.

La temperatura a cui il siero del sangue diviene solido senza perdere la sua trasparenza, e il tempo necessario alla sua solidificazione non si possono precisare esattamente, poichè variano a seconda dell'animale da cui si è preso il siero, e a seconda del suo contenuto di acqua. Si può dire però che in generale il siero del sangue di agnello coagula più presto, e più lentamente invece quello di vitello, che il tempo varia da 1/2 a 1 ora e la temperatura oscilla fra 65-75° C.; cosicchè quando il calore interno è giunto a 65° C., bisogna farlo aumentare lentamente e con cautela. È necessario perciò di esercitare un'osservazione continua, agitando di tanto in tanto la cassetta, oppure prendendo in mano i singoli tubi, per vedere se il liquido diviene consistente. Lo stesso siero anche nei diversi tubi si solidifica in tempi diversi: appena si è verificato il coagulamento in un tubo, lo si deve subito estrarre, avendo anzi l'avvertenza a che resti nel fondo una parte di siero liquido, il quale serve a sopperire alla perdita di acqua che si fa poi inevitabilmente per evaporazione attraverso il piumacciolo di cotone, rendendo col tempo il siero improprio allo sviluppo dei microbi. Se si mantiene a una temperatura fra 65° e 68° C., il siero coagula più lentamente, ma conserva

meglio la sua trasparenza; tanto più la temperatura si avvicina a 75° e tanto più presto avviene la coagulazione, ma il siero diventa leggermente opaco. Se poi la temperatura va al di là di 75°, il siero si fa torbido e non è più servibile.

Stufe.

Per mantenere le culture a una temperatura moderata costante che ne favorisce lo sviluppo, si hanno i cosidetti *termostati* o *stufe a temperatura costante*. Ve ne sono di varie specie. Uno dei più semplici è costituito da una cassetta quadrangolare

Fig. 9 — Stufa d'Arsonval.

perfettamente uguale a quella descritta disopra, ma di maggiori dimensioni e fornita di un termometro e di un termoregolatore. La stufa più comunemente adoperata, che serve assai bene se si vuole avere una temperatura veramente costante, è quella di Arsonval (Fig. 9), nella quale le oscillazioni di temperatura

sono quasi inapprezzabili, giacchè non arrivano che a 0,1° C., o poco al di là.

Nella figura si vedono disegnati separatamente l'apparecchio d'Arsonval e il termoregolatore a membrana di Schlösing che vi è unito. Il primo è composto da un cilindro a parete doppia con un largo spazio interstiziale destinato a ricevere una grande quantità di acqua; questo cilindro si continua in basso con una superficie di riscaldamento conica, a parete doppia, che termina in un tubo piuttosto largo. Il fondo di questo tubo è provvisto di fenditure, le quali si possono allargare e restringere per mezzo d'un disco mobile, munito esso pure di fenditure corrispondenti, e servono a regolare l'ingresso dell'aria nell'interno della stufa. Nel punto d'unione della parte cilindrica colla parte conica dell'apparecchio è situata una graticcia, sopra cui si posano i vasi contenenti le culture. Lateralmente, vicino al margine superiore del cilindro, trovasi il termoregolatore a membrana di caoutchouc, qui sotto descritto. Si riempie dal foro superiore lo spazio interparietale del cilindro con acqua bollita (priva d'aria), in modo che neppure una bolla d'aria vi rimanga dentro; e questo si ottiene mediante la disposizione obliqua della superficie superiore del cilindro stesso.

Il coperchio è parimenti a parete doppia ed è fornito di quattro fori, dei quali due lo attraversano in tutto il suo spessore, e due immettono nella cavità interparietale del coperchio stesso. Quest'ultimo si riempie di acqua, e se ne misura la temperatura con un termometro posto in uno dei fori anzidetti. Con un altro termometro, che attraversa tutto il coperchio, si misura la temperatura dello spazio interno della stufa.

Il termoregolatore a membrana di Schlösing (Fig. 9 A) consta essenzialmente di due camere *a* e *b*, di cui la prima (*a*), fissata al cilindro, è in comunicazione colla cavità interparietale del medesimo piena d'acqua, ed è divisa dalla camera propria del termoregolatore (*b*) per mezzo di una membrana di caoutchouc, disegnata nella figura come una linea oscura, la quale è tenuta distesa da sei viti (*k*). Alla camera *b* è unita ermetica-

mente mediante alcune viti la capsula *c*, entro la quale scorre, per mezzo d'una vite e di una madrevite, il tubo *d* che serve per l'afflusso del gaz dal contatore. Sulla porzione interna di questo tubo scorre a dolce sfregamento un altro tubo sottile, sovrapposto (*f*), che termina con una lamina, la quale è spinta contro la membrana di caoutchouc per mezzo della spirale *h*. Il tubo *d* ha poco lungi dall'apertura interna un piccolo forellino di 1/2 millimetro di larghezza, che permette il passaggio del gaz anche quando la membrana chiude completamente la estremità del tubo stesso, facendo sì che le fiammelle disposte a cerchio sotto la stufa possano bensì diventar piccole, ma non spegnersi del tutto. Un tubo di caoutchouc deve porre in comunicazione il tubo di deflusso *n* del termoregolatore col tubo *f*, fissato alla parte inferiore della stufa, che porta le fiammelle; un altro tubo deve collegare quello di afflusso *d* colla sorgente del gaz, la quale deve essere fornita di un regolatore della pressione, per togliere le oscillazioni periodiche della stessa.

Per portare l'apparecchio ad una data temperatura costante, ecco come si procede. Si riempie, come ho detto, completamente di acqua bollita lo spazio interparietale del cilindro e si colloca nell'apertura sua superiore un termometro, in modo però che l'eccesso di acqua, che si ottiene pel riscaldamento e per la dilatazione della stessa, possa escire liberamente da quell'apertura. Si riscalda l'acqua fino al grado di temperatura che si desidera; si toglie allora il termometro, si riempie con altra acqua lo spazio lasciato vuoto da quello finchè l'acqua trabocca, e vi si caccia dentro un sughero che porta il tubo di vetro capillare *c*. L'acqua sale nel tubo fino a una certa altezza che si deve notare, perchè deve essere mantenuta sempre la stessa. In tal guisa l'apparecchio resta definitivamente regolato per quella data temperatura, ed in qual maniera ciò avvenga si spiega facilmente osservando la costituzione del termoregolatore. Finchè infatti l'acqua trova libero sfogo dall'apertura superiore del cilindro, il gaz ha libero afflusso e la temperatura seguita ad elevarsi; ma appena in quell'apertura si adatta il tappo col tubo di vetro *c*, la colonna di

acqua quivi contenuta esercita una pressione ognora crescente sulla membrana di caoutchouc, pressione che vincendo la elasticità della spirale opposta, spinge sempre di più la membrana presso l'orifizio del gaz, regolandone in tal modo l'escita.

Nel momento in cui si toglie il termometro e si colloca il tubo, la membrana deve andare a toccare l'apertura interna del tubo di afflusso del gaz, sicchè questo non passa più che per la piccola apertura del tubo che è larga 1/2 mm., e le fiammelle diventano perciò nell'istesso istante più piccole. Se questo non accade, ciò vuol dire che il tubo di afflusso *d* trovasi troppo distante dalla membrana di caoutchouc, ed allora non si ha che avvitare il tubo stesso finchè si vedono le fiamme diminuire, e fissarlo in questa posizione per mezzo della piccola controvite *m*.

Una volta regolato l'apparecchio per una certa temperatura, si può spegnere e riaccendere ripetutamente le fiamme e si è sicuri di ottenere sempre di nuovo il medesimo grado di calore. Soltanto bisogna badare a che la colonna d'acqua nel tubo *c* abbia sempre la stessa altezza, segnata al momento in cui si pone nell'apparecchio, perchè eserciti sempre la stessa pressione sulla membrana di caoutchouc; e siccome per evaporazione si perde acqua continuamente, bisogna di quando in quando aggiungerne fino all'altezza stabilita.

Questo termoregolatore che va unito alla stufa d'Arsonval è abbastanza esatto, giacchè, usando tutte le avvertenze suaccennate, si possono limitare le oscillazioni della temperatura a 0,1-0,2° C. Non si adatta però facilmente a tutti gli apparecchi, ed anzi per le altre stufe si adoperano generalmente altri regolatori, che sono più semplici ed anche più comodi da mettersi in uso.

Di questi mi limiterò a descrivere i due più comunemente usati, quello cioè di Reichert e quello di Lothar Meyer (1).

---

(1) Lothar Meyer, Berichte d. d. chem. Gesellschaft, 1883, p. 1089.

Nel termoregolatore di Reichert (Fig. 10) l'apertura di afflusso del gaz viene regolata per mezzo della dilatazione del mercurio, operata dal riscaldamento. È composto di un vaso *C*, pieno di mercurio che si continua con un tubo termometrico, il quale si allarga in alto in un cilindro; in questo si immette a tenuta d'aria il tubo *A* per l'afflusso del gaz, fino a che con la sua estremità tocca il principio del tubo termometrico. Il gaz va poi alla lampada passando pel tubo *B* attaccato al cilindro. Per regolare l'apparecchio avvi lateralmente al tubo termometrico un altro tubo, egualmente pieno di mercurio, e chiuso da una vite di ferro *S* che si muove facilmente.

Fig. 10.

Ecco come si adopera l'istromento. Il tubo d'afflusso *A* si gira in modo che la sua piccola apertura *a* corrisponda esattamente all'apertura del tubo di efflusso *B*. La vite *S* deve essere disposta in modo che allorquando si è ottenuto quel grado di temperatura che si vuol mantenere costante, il mercurio arrivi precisamente all'estremità superiore del tubo capillare; si spinge allora in su il mercurio finchè la fiamma comincia appena a diventare piccola, e l'operazione è terminata, giacchè il tubo *A* vien chiuso dal mercurio, e la fiamma non vien più alimentata che per mezzo del foro *a*. Si può anche variare, corrispondentemente alla temperatura che si desidera, la grandezza della fiamma stessa girando il tubo d'afflusso *A*, in modo che l'apertura *a* corrisponda più o meno completamente al tubo di efflusso.

Dopo qualche giorno che si usa, bisogna avere l'avvertenza di togliere con un pennello dalla superficie del mercurio il deposito polverulento, che vi si forma in causa delle impurità del gaz, il quale altrimenti altererebbe la sensibilità dell'apparecchio. Le oscillazioni di temperatura che si hanno con questo regolatore sono di circa 0,2° C.

Il regolatore di Lothar Meyer (Fig. 11) agisce per mezzo della dilatazione del vapore di un liquido, il cui punto di ebollizione non oltrepassa il grado di temperatura che si deve raggiungere nell'apparecchio. Senza dilungarmi in ulteriori descrizioni, dirò che per usarlo si unisce l'estremità superiore ripiegata del tubo regolatore *q* colla sorgente del gaz, il tubo *p* con una lampada a gaz, e si pone il regolatore vicino ad un termometro normale entro un largo bicchiere di vetro pieno d'acqua, che si riscalda cautamente fino alla temperatura che si vuole nell'apparecchio per le culture. In questo momento si spinge il tubo regolatore nel mercurio sottostante finchè la fiamma del gaz diventa piccola, notando sulla scala a millimetri che è unita al regolatore cotesta posizione. A questo punto si colloca l'istromento nella stufa, la quale si riscalda gradatamente fino a quella data temperatura.

Fig. 11.

Altri regolatori vi sono che agiscono per mezzo della dilatazione dell'aria, o colla membrana di Schlösing, o per mezzo della elettricità, dei quali omettiamo la descrizione perchè il principio per cui agiscono è in tutti quasi lo stesso.

La stufa d'Arsonval anzidescritta funziona bene, ma ha l'inconveniente che serve a contenere un numero limitato di culture, e specialmente non è adatta a contenere le grosse campane di vetro colle patate. A tale uopo nel laboratorio del D.re Frobenius in Monaco di Baviera ho visto adoperare un termostato grande foggiato ad armadio con parecchi ripiani, a parete doppia, aventi il termometro e il termoregolatore nella parete superiore, come al solito. La costruzione di questo apparecchio e il modo di usarlo non hanno nulla di speciale, e basta quindi per comprenderlo il semplice disegno qui presente (Fig. 12), che è stato riprodotto da un apparecchio consimile che si adopera nel laboratorio di anatomia patologica di Torino. Posso aggiungere soltanto

che un tale termostato è assai comodo, perchè dà agio di fare contemporaneamente un gran numero di coltivazioni nei mezzi di nutrizione i più svariati.

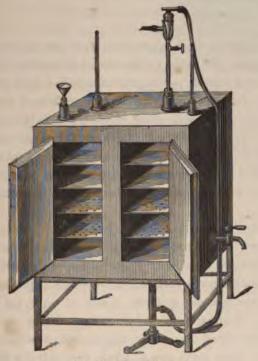



Fig. 12 — Termostato grande.

Ancora una particolarità praticamente interessante a proposito dell'uso di questi apparecchi. Il Koch per ovviare al pericolo che si formino miscugli di gaz esplosivi, nel caso che si spengano le piccole fiammelle della stufa e il gaz si diffonda per lungo tempo nell'atmosfera, ha fatto recentemente costruire una speciale lampada a gaz, la quale chiude da se stessa l'afflusso di questo, non appena per un accidente qualsiasi la fiamma si spegne. Queste lampade del Koch sono poste in vendita dal Muencke di Berlino (Louisenstr. 58).

Stromenti accessori.

Oltre questi grandi apparecchi, avvi poi una serie di altri piccoli oggetti che hanno un'importanza secondaria, ma che sono tuttavia assai comodi per la pratica manuale delle ricerche micologiche. Tali sono ad esempio le *cestine* fatte di rete di fil di ferro zincato, una delle quali si vede disegnata entro la stufa per la sterilizzazione ad aria secca. Il fondo di queste viene coperto da uno strato d'ovatta, e servono a contenere i tubi d'assaggio colla gelatina o col siero di sangue, per poterli trasportare comodamente e senza pericolo di romperli negli apparecchi di sterilizzazione.

Un altro oggetto consimile è la *scatola di lamiera di ferro* rettangolare, che serve a contenere le lastre di vetro che si devono sterilizzare a 150-160° C., e sulle quali si distende in lamina la gelatina per le culture. Perchè questa acquisti sulla lastra di vetro uno spessore uniforme e non si versi sui margini, è necessario di situarla in posizione esattamente orizzontale: a questo scopo serve un piccolo apparecchio livellatore, simile a quello che viene usato dai fotografi, che si trova descritto nel capitolo che riguarda il modo di preparare la gelatina per le culture.

Le campane doppie di vetro, specie di grandi cristallizzatori, tappezzate di carta bibula bagnata, servono benissimo come *camere umide* per contenere le culture che si fanno sulle patate, o sui portoggetti, o sulle piccole scatole di vetro contenenti la gelatina o il siero del sangue, come sarà esposto a suo tempo parlando del modo di fare le culture nei diversi mezzi di nutrizione.

Debbo dire finalmente che per poter situare in una stessa campana parecchie lastre di vetro colla gelatina o coi portoggetti,

le si pongono in serie una sopra l'altra su piccoli banchetti di vetro quadrangolari.

Altri oggetti che si adoperano per le culture, quando se ne vuol seguire lo sviluppo coll'aiuto del microscopio, sono le cosidette *camere umide da coltivazione*. Di queste se ne sono costrutte in gran numero e con varii sistemi. L' Hoffmann ne ha ideato l'applicazione la prima volta nel 1857, praticando una finestra quadrata in un pezzo di cartone disinfettato, ed applicandolo, dopo averlo bagnato d'acqua distillata, sul vetro portoggetti. Su questa finestra applicava poi un coproggetti, portante sulla sua superficie inferiore una goccia di liquido nutritivo coi germi da coltivare. In seguito questo apparecchio semplicissimo fu modificato dall'Hilgendorf e dall'Hallier, che ne costrusse uno adatto a permettere il rinnovamento dell' aria. Altri consimili furono poi proposti dal De Bary, dal Rindfleisch, dal Recklinghausen, dal Griffini e da altri, i quali tutti si studiarono di far sì che nei loro apparecchi fosse possibile il mantenersi delle principali condizioni di vita dei microrganismi (umidità, presenza dell'aria ed un certo grado di temperatura), senza permettere in pari tempo l'ingresso di germi stranieri. Sarebbe superfluo il darne qui la descrizione, giacchè molti non corrispondono alle condizioni anzidette, ed altri sono inoltre assai complicati e di applicazione difficile. Dirò soltanto che ora s'usano d'ordinario per tale scopo le *camere* del Nachet, oppure nel maggior numero dei casi semplicemente i *portoggetti incavati*, su cui si adatta il coproggetti con una goccia della sostanza di nutrizione che contiene i germi da coltivare, chiuso all'intorno con vasellina o con altre sostanze oleose.

I perfezionamenti portati dal Koch nei metodi di cultura, e l'uso delle sostanze di nutrizione solide e trasparenti rendendo superflue la maggior parte di quelle precauzioni, che si prendevano una volta per escludere l'ingresso di altri germi, ha pure tolto la necessità dell'uso di quelle camere umide speciali. Le piccole scatole di vetro doppie (*Dosen*), sulle quali si può distendere uno strato sottile di gelatina o di siero di sangue sterilizzato e fatto

quindi coagulare, servono egualmente bene per le culture da osservare al microscopio, giacchè se anche un qualche germe viene deposto dall'aria sulla superficie della gelatina o del siero, si sviluppa sul luogo dove cade senza rovinare la cultura.

Le *boccette coniche* di Erlenmeyer servono per contenere e per farvi sterilizzare la pappa di pane.

Oltre a questi oggetti bisogna sempre aver in pronto un gran numero di pipette, semplici o graduate, di varie dimensioni, che si tengono entro appositi recipienti di vetro chiusi con ovatta, per farle sterilizzare a 150-160° C, come di solito.

Non isto qui a descrivere il *torchio* per premere la carne che serve a preparare la gelatina nutritiva, perchè è simile a quello usato dai farmacisti, e specialmente perchè un tale stromento non è indispensabile, potendosi l'infuso di carne premere egualmente colle mani attraverso un semplice panno di tela, accuratamente pulito con previa bollitura. Altrettanto dicasi dell'imbuto ad acqua calda, a parete doppia, che serve a filtrare la gelatina, il quale è tanto semplice, che basta vederlo per comprenderne l'uso senza bisogno di apposita descrizione.

Per terminare quanto si riferisce a questo soggetto, dirò brevemente di alcuni apparecchi usati primitivamente dal Pasteur per le sue culture nei mezzi liquidi, giacchè hanno un interesse storico notevole, essendo state le ricerche del gran chimico francese quelle che hanno aperto la strada ai cultori di questi studi, ed hanno reso possibile così il miglioramento del metodo per opera degli osservatori posteriori. Hanno inoltre interesse perchè le culture nei liquidi si usano anche oggidì con vantaggio in certi casi speciali, e si può dire anzi che sono tuttora necessarie per lo studio accurato e completo delle proprietà biologiche dei microrganismi.

Il primo apparecchio usato dal Pasteur, col quale egli ha fatto le sue esperienze per combattere la teoria della generazione spontanea, consisteva in un semplice palloncino di vetro col collo allungato e ripiegato in basso, destinato a trattenere i germi dell'aria. In seguito ha usato le bottiglie a tubulatura doppia di modelli diversi.

Non fa bisogno di particolare descrizione per comprendere il modo di usare questi apparecchi: un tubo, quello ricurvo, è destinato a privare l'aria dei suoi germi prima che arrivi a contatto del liquido di cultura; e questo si introduce, dopo averlo sterilizzato, per un altro tubo che viene chiuso con un piumacciolo di cotone o di amianto. Per riempire gli apparecchi, per farvi le seminagioni e tutte quelle altre manipolazioni necessarie, questi si aprono entro una larga cassa di vetro colle pareti tappezzate di carta da filtro umida, destinata a fissare tutti i germi dell' aria che vi si contiene. L'operatore eseguisce le manipolazioni per mezzo di due aperture laterali, esistenti in questa cassa di vetro. Il Tyndall (1) usa per lo stesso scopo una camera di vetro, le cui pareti sono spalmate di glicerina, che viene lasciata a sè per qualche giorno.

Gli inconvenienti di questi stromenti, e quelli del metodo di cultura coi liquidi in generale, trovansi esposti nel capitolo che tratta delle materie di nutrizione e del modo di coltivare isolatamente le varie specie di microrganismi.

Disinfezione degli oggetti.

Quest' operazione deve essere eseguita su tutti gli oggetti ed istromenti che si adoperano per le ricerche, e deve farsi accurata quanto mai poichè costituisce uno dei capisaldi fondamentali per la buona riuscita delle stesse. Per quanto non si possano esporre su ciò regole molto minute, che si apprendono meglio colla pratica, pure non si può mai raccomandare abbastanza di attenersi col maggior rigore possibile alle norme generali che andrò ora esponendo. Queste ricerche infatti non offrono in sè alcuna seria difficoltà, ma sono tuttavia assai delicate e richiedono un' osservanza scrupolosa di un mondo di

(1) TYNDALL, *Les microbes*, p. 55. Paris, 1882.

dettagli, la cui pratica non si apprende se non dopo una diligente osservazione ed un lungo esercizio.

Basti per ciò rammentare che, mentre si va alla ricerca di una data specie di microrganismi, noi siamo per ogni dove circondati da un'infinità di germi delle specie affini. Ve ne sono in grandissimo numero sospesi nell'aria, ve ne sono aderenti alle nostre mani e ai nostri vestiari, in una parola, dappertutto; e se non si può essere assolutamente sicuri che non ne siano inquinati gli oggetti di che ci serviamo, non si può neanche riposare tranquilli sull'esattezza dei risultati che si ottengono.

È noto che le forme semplicemente vegetative di questi esseri non hanno un gran potere di resistenza agli agenti esterni fisici e chimici, ma che invece le spore sono resistentissime, ed è assai ristretto il numero delle sostanze chimiche che meritano realmente l'appellativo di disinfettanti, inteso nel senso che vuole oggi la scienza, che cioè sieno atte non solo a sospendere, ma anche a distruggere la vita di qualsiasi forma di microrganismi. Non dee adunque far meraviglia se vengono proposti per la *sterilizzazione* degli stromenti gradi di temperatura assai elevati e soluzioni chimiche concentrate, e se tuttavia, malgrado tutto ciò, le culture vanno non di rado perdute per lo inquinamento di germi rimasti aderenti agli oggetti che le contengono, più spesso che non pei germi introdotti coll'aria.

Gli agenti chimici, più comunemente adoperati per la disinfezione degli oggetti, sono l'acido fenico in soluzione forte (5 %) oppure in soluzione debole (2 $^1/_2$ p. $^0/_0$), secondo i casi, ma più di tutto il sublimato corrosivo in soluzione concentrata (1 $^0/_0$). Questa si adopera sia per lavare la punta delle dita prima di toccare strumenti che furono già sterilizzati, sia per isterilizzare gli oggetti di vetro, sia infine per lavare la superficie corporea degli animali nel punto su cui si vuol fare lo innesto, o in tutta la porzione di pelle che si deve incidere col coltello quando se ne fa la necroscopia.

Per ottenere la sterilizzazione dei tubi d'assaggio, nei quali si devono mettere le sostanze di nutrizione per le culture, per la

disinfezione delle siringhe speciali del Koch (1) che servono per le iniezioni sottocutanee e intravenose, e per quella di tutti gli altri oggetti di vetro (capsule pel siero di sangue, lastre di vetro, vetrini portoggetti e pipette), si usano le regole seguenti. Si lavano anzitutto o con una soluzione concentrata di acido minerale (SO^4H^2), se gli oggetti sono tutti di vetro, oppure colla soluzione forte di acido fenico al 5 %, se sono di vetro e di metallo; si lavano quindi con quella di sublimato all'1 % ed infine, dopo aver tolto qualsiasi traccia di sublimato coll'acqua distillata e sterilizzata, si lavano un'ultima volta coll'alcool, e si sottopongono nelle stufe a secco ad un calore di 150° per 1-2 ore di tempo, calcolandolo dal momento in cui la temperatura ha raggiunto il grado anzidetto. I tubi da saggio vengono chiusi in precedenza, il più ermeticamente che si può, con un turacciolo di ovatta bianca che viene così sterilizzata insieme col tubo.

Le pipette e tutti gli altri oggetti, che si devono poi mantenere sterilizzati per l'uso giornaliero, si racchiudono tutti insieme entro grandi recipienti di vetro chiusi con un coperchio pure di vetro, rovesciato sopra a mo' di campana, che serve meglio ad impedire l'ingresso dei germi dell'aria, che non i coperchi ordinari a smeriglio. Le lastre di vetro ed i portoggetti, su cui si distende la gelatina, sono contenuti in apposite cassette di lamiera metallica, ed i tubi d'assaggio nei cestelli quadrangolari di filo di ferro zincato. Nello sterilizzare le siringhe del Koch bisogna avere l'avvertenza di non lasciare lo stantuffo in fondo al cilindro, come si usa fare in generale nelle siringhe che sono vuote, ma sibbene di lasciarlo a metà di questo, perchè altrimenti, disseccandosi lo stantuffo col calore, riesce poi difficile il muoverlo.

---

(1) Questa siringa non ha nulla di particolare, all'infuori che l'unione della parte metallica col cilindro di vetro è fatta per mezzo di una vite incisa su questo, e vien chiusa ermeticamente da una laminetta di sughero, che si può cambiare ogni volta che fa bisogno. Lo stantuffo, invece che di cuoio, è fatto di cotone oppure di filo d'amianto, e lo si inumidisce ogni volta con acqua distillata e sterilizzata.

La disinfezione dell'ago di platino che serve per gl'innesti (composto di un pezzo di filo di platino lungo 5-6 cent., infitto nell'estremità d'una bacchetta di vetro liquefatta col calore della fiamma del gaz), e quella dei coltelli, forbici, pinze e di tutti in genere gli stromenti che servono per la pratica degli innesti o per le necroscopie degli animali inoculati, si compie arroventandoli nella fiamma del gaz o dell'alcool *ad ogni singola volta*, e lasciandoli poi raffreddare proteggendoli dalla polvere. A questo riguardo giova ricordare un piccolo dettaglio pratico assai utile per risparmiare, per quanto si può, gli stromenti. Il grado di arroventamento sufficiente pel nostro scopo si raggiunge anche prima del calore rosso, ossia quando l'oggetto riscaldato, posto a 2-3 cent. di distanza dal viso, lascia sentire chiaramente il calore radiante.

I piccoli stromenti, quali siringhe, forbici, bistorì, ecc., si possono sterilizzare tutti insieme in un grosso recipiente di vetro chiuso con ovatta, oppure dentro una scatola di lamiera di ferro, dove si mantengono disinfettati fino al momento che si vogliono adoperare.

Nelle ricerche che si fanno fuori di un laboratorio, quando non si ha la stufa ad aria secca per disinfettare tutti questi oggetti alla temperatura voluta di 150° C., si sterilizzano direttamente sulla fiamma di una lampada a spirito. La fiamma del gaz è meno adatta perchè riscalda troppo e troppo rapidamente, producendo sovente la rottura degli oggetti di vetro.

Per isterilizzare in tal guisa i tubi da saggio che servono a contenere la gelatina o il siero di sangue, dopo averli lavati coll'acido solforico, col sublimato e coll'alcool, e dopo di averli fatti disseccare accuratamente (devono essere ben disseccati per evitare che si rompano nel riscaldarli sulla fiamma), si chiudono con ovatta e si spinge il turacciolo colle punte d'una pinzetta precedentemente arroventata bene addentro nel tubo; si fanno riscaldare sulla fiamma, fortemente e per un certo tempo, anzitutto i due terzi inferiori; si lascia raffreddare finchè si può tenere con mano, e si ripete quindi la stessa operazione nel terzo su-

periore del tubo: qui bisogna badare specialmente a sterilizzare bene l'ovatta, del che si è sicuri quando questa ha assunto un colore bruniccio. A tal punto colle stesse pinze arroventate si tira fuori il turacciolo di cotone, tanto che si possa poi all'occorrenza trar fuori liberamente anche colle dita.

La disinfezione delle lastre di vetro, che sono state in precedenza lavate e disseccate, si ottiene facendo riscaldare fortemente sulla fiamma una delle due superficie della lastra, e poggiandola poi colla superficie riscaldata rivolta all' insù sopra un apposito banchetto di vetro, situato in posizione orizzontale sull'istromento a ciò destinato; si copre subito con una campana, e si lascia raffreddare finchè sia pronta a ricevere la gelatina per le culture.

Il processo di sterilizzazione sulla fiamma ad alcool delle pipette e delle piccole capsule di vetro è inutile descriverlo. Soltanto riguardo alle pipette è da notare che è utile chiuderne l'estremità superiore con un piumacciolo d'ovatta, il quale impedisce l' ingresso ai germi dell' aria, e permette di aspirare i liquidi egualmente.

Le siringhe di Pravaz, dopo averle accuratamente lavate colla soluzione d'acido fenico, si possono anche sterilizzare, come io uso di fare, riempiendole con acqua distillata e facendo bollire questa sopra la fiamma entro al cilindro della siringa stessa munita dell'ago, attraverso il quale sfugge il vapore acqueo che lo disinfetta. Si può ripetere l'operazione tre o quattro volte per essere sicuri di avere ottenuto l'intento. Appena dopo sterilizzati, si chiudono entro un recipiente di vetro parimenti disinfettato e quivi si conservano.

CAPITOLO III

Sostanze coloranti e metodi di colorazione.

Altrettanto importante che l'uso dell'apparecchio di illuminazione fu per la tecnica della ricerca dei microrganismi l'introduzione dei colori di anilina, fatta specialmente per opera del Weigert e dell'Ehrlich e migliorata poi notevolmente dal Koch.

In principio si era dal Recklinghausen posta a profitto la proprietà che hanno i microbi di resistere all'azione degli acidi e degli alcali, più che gli elementi organici dei tessuti; cosicchè, sottoponendo all'azione di tali reagenti un tessuto che contiene microrganismi, questi conservano la loro apparenza inalterata, mentre i tessuti rimangono disciolti o rigonfiati e scompaiono più o meno all'occhio dell'osservatore.

Un tal metodo di ricerca può servire a dare la certezza della presenza dei microbi, quando questi si trovano in gran numero e riuniti sotto forma di zooglee. Appena però si trovano isolati o commisti ad una grande quantità di detritus granulari, come anche quando sono molto sottili, un tal mezzo non è più sufficiente; sia perchè vi sono nei tessuti alcune specie di granulazioni che resistono all'azione di quei reagenti altrettanto che i microbi, come anche perchè alcuni di questi, piccoli e delicati, si alterano per l'azione degli alcali e degli acidi come i tessuti.

Il metodo della colorazione è adunque indispensabile per siffatti studi; e per quanto finora sia basato su dati puramente empirici, ci è tuttavia di un grandissimo aiuto, tanto che la scoperta di alcuni microparassiti, di quello della tubercolosi, ad es., è dovuta specialmente all'essersi trovato empiricamente il modo speciale di comportarsi degli stessi verso le sostanze coloranti.

Generalità della colorazione.

Premettiamo alcune cose generali sulla colorazione, a mo' di introduzione, prima di esporre i dettagli relativi al modo di trattare i liquidi e i tessuti dell'organismo animale, in cui si devono ricercare i microrganismi.

Noi siamo ancora perfettamente all'oscuro sui processi microchimici che avvengono nell'atto della colorazione degli elementi organici dei tessuti: dobbiamo adunque per ora accontentarci della classificazione proposta dall' Ehrlich, basata semplicemente sul fatto empirico, che talune sostanze coloranti hanno la proprietà di tingere i tessuti uniformemente in tutte le loro parti, ed altre invece posseggono un' azione cosidetta *elettiva*, hanno cioè la proprietà di fissarsi in alcuni elementi e di lasciare gli altri incolori, in tutto od in parte. Più esattamente però deve dirsi che l'azione elettiva della maggior parte di queste ultime sostanze non è immediata, giacchè a prima giunta la colorazione è diffusa, ma si può facilmente localizzare a certi elementi mediante un trattamento successivo abbastanza semplice; e questo consiste nel porre il tessuto colorato in contatto con sostanze, che hanno colla materia colorante un'affinità maggiore che certi elementi e minore invece che altri, i quali soltanto perciò ritengono la primitiva colorazione.

Il linguaggio con cui ho dovuto spiegare la cosa non è punto scientifico, ma è necessario mantenerlo, finchè la ragione dei fatti suesposti sfugge alle investigazioni della scienza.

Abbiamo adunque due specie di colorazione, e corrispondente-

mente due gruppi di sostanze coloranti: le prime, aventi un'azione *diffusa*, sono composte da una sostanza colorata che funge da acido e da una base incolora, nelle altre invece la sostanza colorata è la base, e l'acido è incoloro. Queste ultime hanno la tendenza di rimanere localizzate soltanto al nucleo cellulare, donde il nome di *colorazione nucleare* (Kernfärbung), dato dai Tedeschi alla colorazione operata da tali sostanze.

Orbene nella ricerca dei microrganismi si adopera quasi esclusivamente quest'ultima specie di colorazione, senza che finora si possa dare alcuna regola generale, nè per la scelta delle materie coloranti nè pel modo di colorazione: si può dire soltanto che ciascuna specie di microrganismi predilige specialmente questa o quella sostanza colorante, questo o quel processo di colorazione.

Una prima differenza più generale, segnalata dal Weigert, esiste fra i micrococci ed i bacilli; i primi si colorano con qualunque di quelle sostanze che servono per la colorazione nucleare, mentre pei bacilli si usano soltanto i colori di anilina. Un'altra proprietà interessante delle materie coloranti, oltre l'azione elettiva, è il cosidetto *potere di colorazione*, ossia la resistenza che offrono, una volta fissate negli elementi dei tessuti, ad essere portate via dai reattivi decoloranti, alcool, acido acetico e glicerina, resistenza che è di vario grado per le singole sostanze coloranti.

Diamo intanto la lista delle principali materie che si impiegano per l'esame microscopico dei microrganismi.

Iodio.

Lo iodio è fra le prime sostanze che sono state adoperate per la colorazione dei microparassiti, ed è stato il Billroth che l'ha introdotta per primo nella tecnica di queste preparazioni. Malgrado che oggi si conoscano molte altre sostanze che corrispondono meglio allo scopo, lo iodio è tuttavia raccomandabile perchè è di uso molto comune, si ha facilmente fra mano ed è pure

molto semplice da applicarsi. Del resto anche recentemente il Nothnagel (1) se ne è servito con vantaggio per lo studio che ha fatto dei microrganismi ordinari delle feci, usando la soluzione seguente del Lugol:

Iodio	1,20
Ioduro di potassio	1,80
Acqua	30,0.

Il Friedländer dà quest'altra formula:

Iodio	1,0
Ioduro di potassio	2,0
Acqua	50,0.

Queste soluzioni si allungano poi con acqua quanto si vuole. In generale i cocci ed i bacilli assumono per opera dello iodio un colorito giallo brunastro.

È da avvertire che lo iodio forma sempre composti chimici facilmente scindibili, epperò anche la colorazione dei microbi presto svanisce.

I preparati che se ne ottengono sono adunque difficili a conservarsi e non si possono chiudere nel balsamo del Canadà, nè tampoco in glicerina: il mezzo che pare li mantenga più a lungo è una soluzione concentrata di gomma.

Ematossilina.

L'ematossilina è già molto migliore dello iodio, ed è stata per la prima volta usata dall'Ebert e dal Wagner, e quindi dal Weigert, nella ricerca dei microbi. Si trova in commercio sotto forma di cristalli rosso-bruni, per lo più impuri; di questi si fa una soluzione satura nell'alcool assoluto, che si mescola poi ad altri liquidi per comporre la soluzione colorante. La formula

(1) Nothnagel, *Die normalen in den menschlichen Darmentleerungen vorkommenden niedersten Organismen*, Zeitschr. f. klin. Med., III, p. 275.

più antica è quella del Böhmer così composta. Si fa una prima soluzione di gr. 0,35 di ematossilina in 10 gr. di alcool assoluto, ed un' altra di 1 di allume in 30 di acqua distillata, e si aggiungono a quest'ultima alcune goccie della prima, finchè si ottiene una bella colorazione violetta.

Il Friedländer (1) dà la formula seguente:

Ematossilina	2,0
Alcool	100,0
Acqua distillata	100,0
Glicerina	100,0
Allume	2,0.

L'Erhlich consiglia poi di aggiungervi qualche goccia d'acido acetico per impedire la colorazione troppo intensa. Se non si ha l'ematossilina, si scioglie nell'alcool l'estratto di legno di campeggio, che si trova facilmente, oppure si raschia il legno e si aggiunge alla raschiatura tanto etere quanto basta per coprirla, lasciandola così finchè ne ha estratto il colore: si decanta allora il liquido e vi si aggiunge, a goccia a goccia, una soluzione acquosa di allume, finchè si è ottenuto un colore violetto scuro.

È importante da notare che le soluzioni suesposte, comunque sieno preparate, non servono se non *otto* giorni almeno dopo la loro preparazione, perchè in principio producono una colorazione rossastra e diffusa. A mano a mano però il colorito si fa violetto ed il liquido acquista la proprietà elettiva, di fissarsi cioè sui soli nuclei e sui microrganismi. Questa trasformazione delle proprietà coloranti si può accelerare, aggiungendo al liquido una piccolissima quantità di ammoniaca, tanto piccola che basta persino esporlo per breve tempo ai vapori d'ammoniaca ed agitare; serve meglio però l'aggiunta d'*una goccia* di una soluzione di carbonato d'ammonio.

Il Bizzozero adopera la seguente soluzione. Si fanno a parte due soluzioni, una di gr. 0,50 di ematossilina cristallizzata in

(1) Friedlaender, *Microscopische Technik*, 2 Aufl. 1884.

gr. 6 di alcool a cui si aggiungono 75 ccm. di acqua distillata, ed un'altra di gr. 2 di allume in 75 di acqua. Si mescolano, lentamente ed agitando, le due soluzioni e si lascia la miscela esposta all'aria per alcuni giorni, finchè ha preso un bel colore azzurro. Vi si aggiunge allora l'acqua perduta coll'evaporazione e 30 gr. di glicerina. Si filtra, e si conserva in vaso non perfettamente chiuso.

L'uso di questa sostanza ha molti inconvenienti. Anzitutto si conserva assai difficilmente, si ossida e precipita; sicchè si deve sempre filtrare la soluzione prima di usarla, per quanto le soluzioni ove entra la glicerina si conservino meglio ed ammuffiscano più difficilmente. Inoltre soltanto le forme di cocci, e neanche tutte, si colorano coll'ematossilina, mentre le forme di bacilli non hanno alcuna affinità con questa sostanza. Si colorano bene invece coll'ematossilina le zooglee.

Nella glicerina la colorazione ematossilinica a poco a poco svanisce, mentre si conserva bene nel balsamo del Canadà, avvertendo però di adoperare come mezzo rischiarante il xilolo, oppure l'olio di legno di cedro, invece dell'olio di garofani che ossida la materia colorante.

Ricordiamo infine che il Weigert ha adoperato la sola ematossilina per la colorazione doppia delle sezioni, giacchè nei nuclei si ha con questa sostanza una colorazione diversa da quella dei microrganismi: egli infatti, trattando colla potassa, o con la potassa e coll'acido acetico, le preparazioni colorate coll'ematossilina, ha ottenùto la colorazione isolata dei microbi senza quella dei nuclei.

Ma su ciò non insisto, essendo ora noto il metodo del Gram, che è assai più sicuro e serve per la maggior parte dei microparassiti. L'ematossilina serve anche, combinata coi colori rossi di anilina, a dare una colorazione doppia, dei nuclei in violetto e dei microbi in rosso.

Carmino.

Per quanto il carmino abbia nella tecnica micologica un uso non molto esteso, pure debbo far menzione di alcune specie dello stesso, che servono pel metodo della colorazione doppia. Questa è basata sul fatto, trovato dal Weigert, che il carmino, mentre ha poca affinità pei microrganismi, ne ha invece una maggiore pei nuclei cellulari che non i colori d'anilina, tanto che è capace di sostituire nei nuclei la colorazione prodotta da queste ultime sostanze. In tal modo, facendo agire prima sui preparati i colori d'anilina e quindi il carmino, si possono avere i nuclei colorati in rosso ed i microbi in violetto (violetto di genziana o di metile).

Picrocarmino. — È il preparato che serve meglio di tutti per la colorazione doppia, *quando è buono.* Dico così, perchè era finora assai difficile ottenere un picrocarmino che desse una colorazione conveniente e sicura; mentre, se è ben preparato, ha pel nostro scopo il duplice vantaggio di contenere già in sè due sostanze coloranti, di impartire cioè ai nuclei un colorito rosso vivace ed al protoplasma cellulare un colorito giallo verdastro, e di conservarsi bene anche nella glicerina.

Il Weigert (1) dice di aver trovato il modo di preparare facilmente un buon picrocarmino, capace di colorare i preparati in 5-10 minuti, senza il pericolo di una colorazione eccessiva anche se vi si tengono immersi per un tempo maggiore. Il suo processo avrebbe pure il vantaggio di poter trasformare un cattivo picrocarmino in un composto colorante buonissimo, e ciò semplicemente combinando il picrocarmino col carmino acido. Egli prende 2 gr. di carmino e li scioglie in 4 gr. di ammoniaca; lascia stare la soluzione per 24 ore, impedendone la evaporazione, e vi aggiunge quindi 200 gr. di soluzione satura di acido picrico. Lascia di nuovo a sè il miscuglio per altre 24 ore e vi aggiunge a goccia a goccia l'acido acetico cautamente, fino a che vede comparire la prima traccia d'un precipitato, che non scompare più coll'agitare del liquido. Si lascia stare 24 ore e si filtra. Ciò malgrado però non si riesce ad ottenere un liquido limpido, ed occorre sempre filtrare prima di adoperarlo: si può renderlo limpido aggiungendo una goccia d'ammoniaca, e dopo un giorno, se la soluzione non è ancora perfettamente trasparente, se ne aggiunge ancora un'altra; e così di seguito finchè si ottiene, 24 ore dopo aggiunto quel po' d'ammoniaca, un liquido limpidissimo. Quest'aggiunta non altera menomamente le proprietà coloranti del picrocarmino, ed ha il vantaggio di evitare la filtrazione ogni volta che si adopera. Se la colorazione che se ne ottiene è troppo gialla, si aggiunge un po' d'acido acetico, se è troppo rossa e

---

(1) Weigert, *Zur Technik der mikroskopischen Bacterienuntersuchungen*, Virchow's Archiv, Bd. 84, (1881), p. 275.

diffusa, si aggiunge un po' d'ammoniaca; se poi si ha un picrocarmino che non colora bene, si aggiunge un po' d'acido acetico e si ottiene così una buona sostanza colorante.

Il Weigert dice di trovarsi contento di questa preparazione, ma il processo, come si vede, è assai lungo e noioso, perchè non si riesce che a furia di prove, che si devono ripetere alla distanza di un giorno l'una dall'altra.

Non istarò a ripetere qui i processi dettati per lo stesso oggetto dallo Schwarz, dal Ranvier, nè tampoco quello del Friedländer (1), perchè provati più volte da me nel laboratorio del Bizzozero, ed anche dallo stesso professore, con risultati sempre poco soddisfacenti. Invece il Bizzozero ha trovato un metodo di preparazione del picrocarmino, che è altrettanto semplice quanto di riuscita sicura. Si sciolgono in un mortaio gr. 0,50 di carmino puro in 3 ccm. di ammoniaca e 50 di acqua distillata: in un altro mortaio si prepara un'altra soluzione di gr. 0,50 di acido picrico in 50 gr. d'acqua. Si versa la soluzione picrica, lentamente e rimescolando sempre, nella prima soluzione e si fa quindi evaporare a bagno maria, finchè non si avverte più che un odore debolissimo d'ammoniaca. In generale a questo punto il liquido è ridotto alla metà del suo volume primitivo (50 ccm.); si lascia raffreddare e vi si aggiunge immediatamente $^{1}/_{5}$ del volume (10 ccm.) di alcool puro. Si conserva in bottiglia ermeticamente chiusa. *Non è necessario filtrarlo prima di adoperarlo.*

Carmino alluminato. — Si sciolgono in un mortaio gr. 1,5 di carmino e gr. 6 di allume in 200 di acqua distillata, e si fa bollire per 20 minuti; si lascia raffreddare e si filtra.

Per conservare le soluzioni di carmino, si aggiungono sempre alcune goccie di soluzione fenica.

Colori d'anilina.

Questo è senza dubbio il gruppo di sostanze che rende i maggiori servizi per la colorazione dei microbi, e la loro applicazione

(1) Friedlaender, Opera citata, p. 35.

si deve specialmente ai lavori del Weigert e del Koch il quale, combinando l'uso dei colori d'anilina col processo di fissazione operato dall'essiccamento, ha creato un metodo speciale che va appunto col nome di « metodo del Koch ».

L'azione di queste sostanze non è *elettiva* nel vero senso della parola, perchè colorano più o meno intensamente tutti gli elementi dei tessuti; hanno però un affinità maggiore verso alcuni e minore verso altri, cosicchè riesce poi facile, usando certi reagenti, lasciare il colore soltanto a quegli elementi che hanno per le aniline una maggiore affinità. Si può dire che i microrganismi, i nuclei e il protoplasma cellulare costituiscono, dai primi all'ultimo, una scala decrescente di affinità verso le materie coloranti in questione; sicchè il principio generale del loro uso è quello di colorire dapprima intensamente tutti gli elementi del preparato, e togliere quindi successivamente il colorito alle granulazioni ed al protoplasma, lasciando colorati i nuclei ed i microrganismi; oppure decolorare anche i nuclei e lasciare tinti soltanto questi ultimi, i quali spiccano sempre più sul fondo incoloro o debolmente colorato. Riguardo all'azione elettiva, i colori d'anilina sono stati divisi dall'Ehrlich in *acidi* e *basici*, a seconda che la sostanza colorante funge in quelle combinazioni da acido o da base: pel nostro scopo si può dire che servono esclusivamente i colori *basici* di anilina, giacchè taluni composti acidi servono soltanto, come ad esempio l'eosina, nella colorazione doppia per dare la tinta al fondo e far risaltare vieppiù i microfiti.

Ecco quali sono i principali colori che si adoperano nella tecnica della ricerca dei microparassiti.

A) Rosso. — *Fucsina, Magdala, Magenta, Diamante, Eosina.*

B) Violetto. — *Genziana* (marca BR) (1) raccomandata specialmente dal Weigert; *violetto di metile* (BBBBB), la *Dahlia* e

---

(1) Questa genziana, raccomandata da Weigert, viene fabbricata dalla « Berliner Actiengesellschaft für Anilinfabrication », Berlin SO, am schlesischen Thor.

finalmente l'*Orceina* (Orseille), sostanza colorante che si estrae da un lichene (Roccella tinctoria) ed è stata la prima volta introdotta dal Wedl (1) nella tecnica microscopica; la si usa specialmente per la colorazione doppia.

C) Bleu. — Si adopera specialmente il *bleu di metilene*, ed è una delle sostanze più usate perchè dà ai microbi un colorito assai delicato e distinto, mentre si può facilmente togliere dai nuclei cellulari. È però il colore d'anilina che ha minor potere di colorazione.

D) Verde. — Il *verde di metile* si usa talora, ma è difficile che sia puro; si trova sempre mescolato col violetto di metile. Avvi anche un *verde d'anilina* e la *crisoidina*.

E) Bruno. — *Bruno di Bismarck, bruno d'anilina* (cosidetto *Neubraun*) e *Vesuvina*. Questi hanno sugli altri colori di anilina il vantaggio di possedere un « potere di colorazione » più forte, sicchè non si lasciano lavare via così facilmente dall'alcool e dagli altri reagenti decoloranti, si mantengono più a lungo e si possono anche conservare in glicerina, cosa che per quelli precedenti non accade. Sono poi specialmente adatti per quei preparati che si vogliono riprodurre per mezzo della fotografia (2).

---

(1) Wedl, Virchow's Archiv. Bd. 74.

(2) Non tutte le sostanze coloranti d'anilina che si trovano in commercio dànno egualmente buoni risultati per la colorazione, e siccome non v'ha una fabbrica unica che le fornisca tutte di buona qualità, ma ciascuna quasi delle migliori proviene da una fabbrica diversa, così fa d'uopo ricorrere a quei rivenditori i quali offrono maggiori garanzie per la bontà dei preparati che essi spacciano. Io darò qui l'indirizzo di alcuni rivenditori e fabbricanti i quali, secondo la pratica di valenti istologi da me interrogati, forniscono le materie coloranti di migliore qualità:

G. König, Berlin N. W. Dorotheenstrasse, 35 A. (Una bottiglia di 10 grammi di materia colorante secca costa marchi 0,50).

Grübler, Phys.-chem. Laboratorium, Leipzig, Dufourstrasse 17.

Trommsdorf, Chemische Fabrik, Erfurt.

Berliner Actiengesellschaft für Anilinfabrication, Berlin SO.

Soluzioni. — Si possono fare coi colori d'anilina quattro specie principali di soluzioni.

a) Soluzione acquosa. — È da premettersi che l'acqua che si usa per le soluzioni coloranti, e per qualsiasi altro scopo in queste ricerche, dev' essere *distillata e sterilizzata* facendola bollire per 1-2 ore. Si scioglie in generale da 1 a 5 grammi di materia colorante in 100 grammi di quest' acqua distillata e sterilizzata; oppure si fa una soluzione acquosa satura, in modo che in fondo alla boccetta rimanga sempre un eccesso di materia colorante, e quando si adopera, si diluisce in un vetrino da orologio pieno d'acqua, fino ad ottenere il grado di colorazione voluta. Se si ha una soluzione piuttosto concentrata, i preparati vi si tengono immersi un tempo minore: ma non è bene che le soluzioni sieno molto dense, perchè in tal caso riesce più difficile la decolorazione successiva. In generale il liquido colorante, posto in un vetro da orologio sopra fondo bianco, deve essere ancora trasparente. Le soluzioni acquose sono quelle che colorano meglio, in più breve tempo e più sicuramente: bisogna però sempre filtrarle prima di adoperarle, perchè formano precipitati e si conservano difficilmente. Si preparano perciò d'ordinario in piccole quantità.

b) Soluzione acquoso-glicerica. — I colori bruni di anilina (bruno di Bismarck, bruno d'anilina e Vesuvina), i quali non possono essere usati in soluzione alcoolica, e sciolti nell'acqua si alterano facilmente, si adoperano sotto forma di soluzione concentrata in un mestruo composto di parti eguali di glicerina e di acqua. Quando però devono servire soltanto a colorare il fondo del preparato, si adoperano anche questi in soluzione semplicemente acquosa.

c) Soluzioni idro-alcooliche. — La materia colorante si scioglie nelle stesse proporzioni suesposte, ma il liquido solvente è composto di 1 parte di alcool puro e di 2 parti di acqua. È preferibile fare una soluzione di 2-4 gr. di sostanza colorante in 85 gr. d'acqua con 15 di alcool, il quale serve ad impedire l'alterazione del liquido. Le soluzioni idro-alcooliche abbisognano

di un tempo più lungo che le acquose per colorire; ma in compenso sono più pure e non dànno precipitati, per cui si può fare a meno di filtrare prima di adoperarle, per quanto però sia sempre miglior cosa il farlo.

d) Soluzioni alcooliche. — In genere si fanno sature (20-25 gr. di sostanza colorante in 100 di alcool) e si diluiscono quindi con acqua distillata nel momento che si adoperano, aggiungendo 5-6 goccie di soluzione in un piccolo vetro da orologio pieno d'acqua. Questa terza specie di soluzioni serve specialmente per quelle materie coloranti che difficilmente si mantengono, ed offre il vantaggio di poter fare a meno della filtrazione.

È da consigliarsi adunque di usare di preferenza le soluzioni puramente acquose, o quelle debolmente alcoolizzate, di sciogliere volta per volta una piccola quantità di materia colorante e di rinnovare spesso le soluzioni.

In generale può dirsi che il potere colorante delle diverse sostanze d'anilina varia a seconda di parecchi fattori; e per ottenere dal loro uso risultati buoni e sicuri, bisogna sempre tener conto delle tre seguenti circostanze, che sono:

1° La natura del veicolo che serve per la soluzione; e di ciò ho parlato or ora.

2° Il grado di concentrazione della stessa. In generale le soluzioni concentrate dànno una colorazione più diffusa, mentre quelle diluite hanno un' azione elettiva più spiccata e più duratura, per quanto colorino più lentamente.

3° La temperatura del liquido colorante; giacchè il calore fa sì che la colorazione si faccia più rapida e più intensa, ed anzi in certi casi rende possibile la colorazione di alcuni elementi patogeni, che non si ottiene nelle condizioni di temperatura ordinarie.

Detto così delle sostanze coloranti e della maniera di prepararle in soluzione, passiamo ora a delineare i processi che si adoperano per colorire i preparati nei quali si ricercano i microparassiti, esponendo prima i metodi generali, quelli cioè che servono per tutti, o per la maggior parte almeno dei micror-

ganismi patogeni finora conosciuti, per parlare quindi di alcuni processi che servono per la ricerca di alcune specie soltanto, e che si credeano caratteristici o specifici delle stesse.

Metodi generali di colorazione semplice.

A) Metodo di Weigert.

Il Weigert (1) è stato il primo ad applicare i colori d'anilina per la dimostrazione dei microrganismi dell'interno dei tessuti, ed il suo metodo, per quanto abbia in seguito subìto numerose modificazioni nella colorazione delle diverse specie di microbi, merita pure di essere esposto, perchè in sostanza è quello che si usa generalmente tuttora, ed è il seguente.

Le sezioni di tessuti indurati nell'alcool si tengono in una soluzione acquosa all'1 p. $^0/_0$ di violetto di genziana per pochi minuti: si ottiene così una colorazione diffusa di tutti gli elementi, e per averla localizzata ai nuclei ed ai microrganismi soltanto, si lavano i preparati in una soluzione diluita di acido acetico; si disidratano quindi nell'alcool assoluto per $^1/_2$ ora od anche 1 ora, si rischiarano coll'olio di garofani e si chiudono nel balsamo del Canadà sciolto nella trementina. Se la colorazione non è eccessiva, si può anche fare a meno del trattamento coll'acido acetico, giacchè basta l'alcool a togliere il di più della materia colorante ed a far sì che la colorazione rimanga localizzata nella maniera anzidetta. Se si lasciano le sezioni troppo a lungo nell'alcool, ciò non nuoce alla riuscita dell'operazione, ma se invece si lasciano troppo tempo nell'olio di garofani, questo finisce col decolorare completamente il preparato. Le particolarità relative al modo di fare le preparazioni da conservare, relative cioè alle sostanze che servono a schiarirle ed a rinchiuderle, si trovano

(1) Weigert, lavoro citato.

esposte nel capitolo seguente, che tratta del modo di ricercare i microparassiti nei liquidi e nei tessuti animali.

Un'avvertenza, a cui dee sempre badare chi si occupa di tali ricerche, è quella di saggiare accuratamente la reazione dell'alcool, per assicurarsi che non sia acida, altrimenti anche i microrganismi perdono la loro colorazione. È bene perciò porre in ogni caso in fondo alla bottiglia, che contiene il cosidetto alcool assoluto, una certa quantità di idrato di calcio.

Una modificazione importante del metodo di Weigert è quella proposta dal Koch per ottenere la colorazione isolata dei microparassiti. Invece di trattarle coll'acido acetico diluito, le sezioni de' tessuti colorate colle tinte d'anilina si pongono in una soluzione allungata di carbonato di potassa, il quale toglie il colore a tutti gli elementi, compresi i nuclei, e lascia colorati soltanto i microbi.

B) Metodo di Koch.

Come il Weigert ha prima di tutti adoperato i colori d'anilina per le sezioni dei tessuti, così il Koch ha pel primo imaginato di unire la colorazione al processo di fissazione dei liquidi per mezzo del disseccamento, creando così un nuovo metodo di ricerca, che porta appunto il suo nome e serve alla colorazione dei *preparati, fatti coi liquidi distesi in istrato sottile sui vetrini coproggetti e quivi fissati col disseccamento rapido a moderato calore* (1).

Tutti i dettagli relativi al modo di preparare il liquido sul coproggetti e di fissarvelo si trovano esposti nel capitolo seguente. Per ora basti sapere che ricerche accurate hanno posto fuori di dubbio il fatto, che il disseccamento rapido, operato a temperatura non troppo elevata, non altera sensibilmente nè la

---

(1) Koch, *Verfahren zur Untersuchung.* ecc., Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. II, Heft 3.

Id. *in Untersuchungen ü. d. Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten*, Leipzig 1878.

Id. in Mittheilungen aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte, B. I, 1881.

forma degli elementi, nè quella dei microbi. Questo vale almeno per la maggior parte dei microparassiti; ve ne ha però di quelli che dopo il disseccamento si fanno più sottili, come ha osservato il Koch a riguardo dei bacilli del carbonchio.

Ciononostante è sul fatto della inalterabilità dei microrganismi sottoposti al disseccamento, come pure sull'altro che questi esseri hanno per i colori basici d'anilina un'affinità maggiore che qualsiasi elemento organico, compresi i detritus granulari, che è basato appunto il metodo presente, il quale è altrettanto semplice quanto sicuro nei suoi risultati.

Lo strato di liquido fissato sul vetrino coproggetti si può colorare in due maniere; o vi si versano sopra alcune goccie d'una soluzione acquosa concentrata d'un colore d'anilina, e ciò quando la colorazione non deve durare che pochi momenti; oppure, se questa deve durare più a lungo, come anche quando è necessario elevare la temperatura del liquido colorante a 40-50° C., si pone questo in un vetrino da orologio e vi si lascia sopranuotare il coproggetti, colla superficie che porta lo strato messa a contatto del liquido stesso. Questo contatto però non deve in generale essere prolungato al di là di 1-10 minuti, perchè se dura più a lungo, si ottiene una colorazione eccessiva che nuoce alla chiarezza del preparato.

Tutto questo va inteso in maniera affatto generale, essendovi alcuni casi, come è quello in cui si tratta di colorare il bacillo della tubercolosi, nei quali bisogna lasciare il preparato nel liquido colorante per parecchie ore.

In ogni caso però si può abbreviare il tempo della colorazione, o renderla, se così si vuole, più intensa, riscaldando il liquido a 45-50° C.: con tal mezzo si riesce a colorare intensamente le capsule dei pneumococci, come ha mostrato il Friedländer.

Colorito che sia in tal guisa il preparato, si può semplicecemente lavarlo bene con acqua distillata e porlo sul portoggetti con una goccia d'acqua, per osservarlo al microscopio; oppure si usano le sostanze decoloranti, quali sono la potassa in soluzione diluita (1 : 10), l'acqua leggermente acidulata con acido

acetico ($^1/_2$ %), oppure meglio di tutti l'alcool assoluto non acido, fatto agire però rapidamente. È da consigliarsi sempre di non colorare eccessivamente le preparazioni, per fare a meno dell'alcool, il quale fa scomparire facilmente certe particolarità dei microparassiti; così le capsule dei pneumococci, trattate coll'alcool, si scolorano facilmente. Se le preparazioni si vogliono conservare, si fanno disseccare rapidamente, passando di nuovo i coproggetti, colla superficie che porta lo straterello rivolta all'insù, sulla fiamma d'una lampada; vi si pone sopra una goccia di balsamo del Canadà, si applicano sul portoggetti e si conservano.

Se si vuole poi con queste preparazioni controllare la purezza d'una cultura, ossia se si vuole avere un criterio esatto delle proprietà morfologiche caratteristiche d'una data forma di microrganismi, è necessario fare l'esame diretto nell'acqua; giacchè se si disseccano di nuovo e si chiudono nel balsamo, come si deve fare per conservarle, si ha sempre un certo grado di retrazione degli elementi parassitari. Preparazioni fatte in tal guisa mostrano colorati soltanto i nuclei e gli elementi parassitari, i quali specialmente appaiono molto evidenti.

Tutti i microparassiti finora conosciuti si colorano, qual più qual meno intensamente e rapidamente, col metodo suesposto; non fanno eccezione neanche i bacilli tubercolari, pei quali si era prima ammessa la necessità di un processo specifico.

Metodo di Gram (1).

Un altro metodo generale di colorazione è quello proposto dal Gram di Copenaga. Questo metodo ha il vantaggio, su quelli ordinari di Koch e di Weigert, di lasciare incolori tutti gli elementi del preparato all'infuori dei microrganismi. La cosa non è nuova, giacchè anche colla modificazione proposta dal Koch al suo metodo primitivo, ossia coll'azione del carbonato

(1) Gram C., *Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trochenpräparaten*, Fortschritte d. Medicin. 1884, N. 6.

di potassa, si era già prima arrivati, sebbene per un'altra via, a colorare isolatamente i microparassiti. Inoltre anche il Cornil (1), quasi contemporaneamente col Gram e indipendentemente da questi, ha usato lo iodio per fissare i colori d'anilina sui micrococci, adoperando un processo assai simile a quello qui appresso descritto; colla differenza soltanto che per la prima colorazione, invece della soluzione di Ehrlich, il Cornil si è servito della soluzione semplice di violetto di anilina β, e per la colorazione del fondo, invece del bruno di Bismarck, ha usato l'eosina.

Al Gram tuttavia spetta il merito della priorità, ma specialmente quello di avere estesa l'applicazione di un tal processo comodissimo a tutte le specie di microparassiti, cosicchè il metodo merita giustamente il suo nome.

Il processo del Gram costituisce in realtà un miglioramento notevole nella tecnica della colorazione, giacchè con quello semplice del Weigert, quando si tratta di tessuti molto ricchi di elementi nucleati (milza, ghiandole linfatiche, polmoni infiammati, tessuto di granulazione, ecc.), gli elementi parassitari rimangono spesso coperti dall'imagine dei nuclei, specialmente se quelli sono delicati, sottili e poco colorati, e se la sezione del tessuto riesce un po' meno che sottile. Col metodo presente invece i soli microrganismi rimangono colorati in violetto scuro, e gli altri elementi del tessuto restano incolori del tutto; cosicchè, anche se vi esiste soltanto qualche microparassita isolato, lo si può al microscopio riconoscere facilmente.

Per la colorazione si adopera la soluzione di genziana e olio di anilina nell'acqua, preparata estemporaneamente alla maniera del Friedländer, come si trova indicato a proposito dei metodi di colorazione dei bacilli tubercolari; oppure mescolando 5 ccm. di soluzione alcoolica concentrata di genziana o di violetto di metile con 100 ccm. di acqua d'anilina. Per maggiore comodità e

(1) Cornil, *Note sur les microbes du phlegmon cutané etc.*, Archives de Physiol., N. 3, avril 1884.

sollecitudine si usa chiudere la bottiglia, invece che col turacciolo, con un imbuto di vetro provvisto di un filtro di carta; e quando si vuole adoperare, si bagna il filtro coll' acqua distillata e si filtra in un vetro da orologio qualche goccia di soluzione. Il filtro può servire per parecchie operazioni, e la soluzione anzidetta si mantiene inalterata lungamente.

In questo liquido si portano i preparati (sia di sezioni, come di liquidi essiccati sui coproggetti), i quali devono precedentemente essere stati nell' alcool assoluto, e non nell' acqua o nell'alcool diluito: vi si lasciano dentro per 2-3 minuti, finchè sono intensamente colorati, e da qui si immergono in una soluzione tenue di iodio e ioduro di potassio, preparata colle proporzioni seguenti:

Iodio	gr.	1,0
Ioduro di potassio	»	2,0
Acqua	»	300

Alcuni consigliano di portare immediatamente i preparati dalla soluzione colorante in quella iodo-iodurata; altri invece di immergerli prima nell'alcool assoluto, e togliere così l'eccesso di materia colorante. Nella soluzione iodica si forma un precipitato', ed i preparati che prima avevano un colorito violetto intenso, diventano color porpora scuro, quasi nero; ciò appena avvenuto (ossia dopo $^1/_2$-2 minuti), si tolgono da questa soluzione e si pongono di nuovo nell'alcool assoluto, dove rimangono finchè la loro decolorazione appaia completa; il che avviene più facilmente, se si ha cura di rinnovare l'alcool per una o due volte.

Io ho avuto spesso occasione di osservare che, se la soluzione colorante è troppo concentrata, oppure se i preparati vi si lasciano troppo a lungo, come anche se si prolunga il loro soggiorno nella soluzione iodo-iodurata, la decolorazione successiva dei nuclei riesce più difficile ed anche incompleta. E così pure ho provato, contrariamente a quanto asserisce il Baumgarten, che si possono adoperare benissimo, collo stesso risultato, invece del violetto di genziana anche gli altri colori basici sciolti nell'acqua d'anilina.

Dall'alcool si portano nell'olio di garofani, dove perdono quel rimanente di sostanza colorante che può essere ancora rimasta nei nuclei, giacchè non si può precisare il tempo che necessita a che l'alcool compia la sua azione decolorante. È sempre consigliabile però di scolorare bene i preparati nell' alcool e non la-

sciarli invece troppo tempo nell'olio di garofani, perchè questo a lungo andare toglie il colore anche agli stessi microrganismi.

Per mezzo di un tal processo, che si potrebbe davvero chiamare col Friedländer l'ideale della colorazione dei microparassiti, qualora venisse dimostrato che serve per tutti indistintamente, questi ultimi spiccano pel loro colorito violetto intenso, quasi nero, sul resto del preparato che appare d'un colore giallo pallido, e si rendono visibili, anche quando sono isolati, meglio che con qualsiasi altro metodo di colorazione semplice nucleare.

Quando si desideri, si può anche avere collo stesso processo una colorazione doppia, immergendo la preparazione, dopo averla decolorata nell'alcool, in una soluzione di vesuvina o di bruno di Bismarck, le quali colorano i nuclei in giallo-scuro, mentre i microbi ritengono la primitiva colorazione.

Invece del bruno di Bismarck o della vesuvina, è meglio usare l'eosina, come ha già fatto il Cornil (1), poichè l'eosina non ha un'azione elettiva sui nuclei, ma dà al fondo del preparato una colorazione rosea uniforme, che fa spiccare assai meglio i microrganismi. Si ottiene così una colorazione doppia, bella quanto quella che si ha dei bacilli tubercolari col metodo Koch-Ehrlich, la quale inoltre ha il vantaggio di servir bene per stabilire i rapporti che hanno i microbi cogli elementi dei tessuti; per stabilire, cioè, se sono liberi, oppure contenuti nell'interno delle cellule o dei vasi.

Le preparazioni così trattate si possono chiudere col balsamo del Canadà sciolto nel xilolo, oppure nel miscuglio di glicerina e gelatina, e si mantengono inalterate anche per mesi. Tutto questo processo non dura più di un quarto d'ora, ed offre inoltre il vantaggio che l'olio di garofani si può tenere anche lungo tempo a contatto coi preparati, senza che alteri un gran che la colorazione dei microparassiti. Tuttavia un'azione troppo prolungata rende sempre più pallido il colorito di questi, e le mie osservazioni non si accordano con quanto dice il Baumgarten, che cioè si possano tenere i preparati, coloriti col metodo di Gram, nell'olio di garofani anche parecchi giorni, senza che si alteri menomamente il colore dei microrganismi.

Lo iodio serve senza dubbio a fissare i colori d'anilina sugli elementi parassitari, giacchè, se dopo avere trattato i preparati colla soluzione iodo-iodurata si immergono in una soluzione alcoolica di acido nitrico od idroclorico al 3 %, si vede che tutte le specie di microbi mantengono il loro colore, come fanno quelli della lebbra e della tubercolosi anche se non vengono trattati collo iodio. Tuttavia questi ultimi possono sempre venire

---

(1) Cornil, lavoro citato.

differenziati immergendo le preparazioni, dopo averle trattate coll'acido, in una soluzione di vesuvina: si vede allora che i bacilli della lebbra e quelli della tubercolosi mantengono il colore primitivo, mentre tutti gli altri prendono un colore bruno non molto intenso.

Se si vuole colorire con questo processo i bacilli tubercolari, bisogna naturalmente fare agire la sostanza colorante per 12 a 24 ore.

Il Friedländer afferma che i bacilli del tifo con questo metodo non si colorano e che i pneumococci qualche volta, trattati in tal guisa collo iodio, si decolorano essi pure. Io credo che questo fatto, anzichè da proprietà speciali di quei microrganismi, dipenda da qualche piccola deviazione involontaria dal metodo anzidescritto, la quale può benissimo accadere nel corso delle manipolazioni, e che spesso fa sì che la colorazione degli stessi microbi riesca or più or meno evidente, ed ora anche non riesca per nulla. Io ho difatti ottenuto ripetutamente, con tal metodo, colorati nelle sezioni tanto i bacilli tifosi come i micrococci pneumonici al pari degli altri microparassiti.

Metodo di Koch-Loeffler.

Un altro metodo generale di colorazione semplice, che si usa di preferenza nel laboratorio del Koch a Berlino, si trova accennato la prima volta in una delle prime pubblicazioni fatte da questi sulla tubercolosi (1). Una descrizione più dettagliata di questo processo è data da Löffler nel suo lavoro sull'importanza patogenica dei microrganismi nella difterite (2). Un tal metodo ha nulla di speciale, all'infuori che in questo, invece delle ordinarie soluzioni dei colori d'anilina fatte nell'acqua o nell'alcool, si adopera il *bleu di metilene sciolto nell'acqua debolmente alcalinizzata*. Il Koch nel lavoro dianzi citato consiglia una soluzione debole di questa sostanza così composta:

1 ccm. di soluzione alcoolica concentrata di bleu di metilene,
100 ccm. di acqua distillata,
0,2 ccm. di soluzione di potasssa al 10 $^0/_0$.

Il Löffler invece consiglia di prepararla mescolando 30 ccm. di soluzione alcoolica concentrata di bleu di metilene con 100 ccm.

---

(1) Koch, *Die Aetiologie der Tuberculose*, Berl. Klin. Wochenschr. 1882, No. 15.

(2) Löffler, Mitth. a. d. kais. Ges., Bd. II, 1884, p. 439.

di acqua contenente potassa nella proporzione di 1: 10,000, ed afferma di avere provato che serve a colorire qualsiasi specie di microbi, meglio di quella debole del Koch.

I preparati coloriti con queste soluzioni si lavano, agitandoli per pochi secondi, in una soluzione debole di acido acetico (1/2 per cento), si tengono per 5 minuti nell'alcool diluito per metà coll'acqua, e quindi per 15 minuti nell'alcool assoluto: si rischiarano nell'olio di legno cedrino e si conservano nel balsamo del Canadà. Con questo metodo si colorano bene tutte le specie di microparassiti conosciuti finora, compresi i bacilli del tifo e quelli della morva.

Metodi generali di colorazione doppia.

L'affinità diversa che i microrganismi e gli elementi dei tessuti animali hanno per le varie sostanze coloranti è stata messa a profitto per creare un nuovo metodo di esame, che è quello appunto della *colorazione doppia*. Il principio generale di questo metodo è di colorare prima il preparato coi colori d'anilina, e di sottoporlo quindi all'azione di un'altra sostanza colorante, la quale va a sostituire la prima in certi elementi lasciando agli altri la primitiva colorazione.

Il Weigert (1), avendo osservato che il violetto di genziana ha più affinità per i microbi che non il carmino, e che invece l'affinità di quest'ultimo per i nuclei è maggiore di quella che hanno per gli stessi i colori d'anilina, ha fondato su ciò un metodo di colorazione doppia, generale per tutti i microrganismi. — Quello che il Weigert ha proposto per le sezioni dei tessuti, il Soubbotine lo ha fatto pei preparati dei liquidi essiccati sui coproggetti, cosicchè si hanno due metodi di colorazione doppia, uno per le sezioni e l'altro pei preparati a secco.

---

(1) Weigert, Lavoro citato, p. 284.

Metodo di Weigert.

Consiste in una combinazione dell'azione colorante del violetto di genziana con quella del picrocarmino. Le sezioni, colorate nel violetto di genziana e trattate coll'alcool assoluto alla maniera ordinaria, si portano per un momento nell'acqua per togliere l'alcool, e si mettono quindi nella soluzione di picrocarmino, preparato col metodo del. Bizzozero. In questa soluzione devono rimanere un po' più a lungo di quello che è necessario per l'ordinaria colorazione nucleare, per dare tempo al picrocarmino di scacciare dai nuclei la tinta data dal violetto di genziana: in generale basta per ciò 1/2 ora od un'ora al più. Si lavano quindi nell'acqua, si disidratano coll'alcool assoluto, si rischiarano nell'olio di garofani e si chiudono nel balsamo. Si possono anche chiudere nel miscuglio di glicerina e gelatina, proposto dal Klebs, ed in tal caso basta lavarli semplicemente nell'acqua e porli quindi nella gelatina: si ottengono in tal guisa preparati bellissimi, nei quali i microrganismi sono colorati in violetto ed i nuclei in rosso; il che serve specialmente per potere studiare bene i rapporti che assumono i microparassiti cogli elementi dei tessuti.

Io ho provato a modificare alquanto questo processo, facendo agire prima il picrocarmino e trattando quindi i preparati col metodo di Gram. Le colorazioni ottenute in tal guisa riescono di una bellezza sorprendente; gli elementi parassitari appaiono di un violetto scuro, quasi nero, i nuclei sono colorati in rosso ed il protoplasma cellullare in giallo-verdastro.

Se si tratta di micrococci, bisogna avere l'avvertenza di non lasciare troppo a lungo il preparato in contatto colla soluzione di picrocarmino, altrimenti anche quelli perdono a poco a poco il primitivo colore e si tingono in rosso.

Si potrebbero per la stessa reazione usare anche altre specie di carmino, ma la combinazione picrica riesce meglio di tutte le

altre, sia perchè oltre di colorare i nuclei in rosso dà anche al fondo (protoplasma, tessuto corneo, fibre elastiche) una leggera tinta giallastra, sia anche perchè si può conservare bene nel miscuglio di glicerina e gelatina.

Una colorazione doppia si può ottenere ugualmente usando la fucsina ed il bleu di metilene. Combinando invece i colori violetti con quelli bruni di anilina (vesuvina, e bruno di Bismarck), la colorazione doppia si ottiene solo nel caso dei bacilli tubercolari, mentre gli altri microparassiti perdono il loro colore violetto in contatto della seconda sostanza colorante, ed assumono anch'essi un colore bruno come il resto del preparato.

Metodo di Soubbotine.

Serve preferibilmente pei preparati a secco. — Lo strato liquido essiccato si fissa esponendolo ai vapori di acido osmico, oppure lavandolo in una soluzione di acido cromico all'1 : 200 o 300; si lava quindi con acqua distillata, e si fa colorire per circa due ore in una soluzione acquosa di *verde di metile* all'1 $^{0}/_{00}$. Si tiene nell'acqua leggermente acidulata per 20-40 minuti, per ottenere la decolorazione dei nuclei e delle granulazioni protoplasmatiche, si lava con acqua pura e si pone per qualche minuto in una soluzione allungata di picrocarmino; si lava di bel nuovo con acqua e si fa disseccare il preparato all'aria o a moderato calore, per chiuderlo finalmente nel balsamo del Canadà. Trattati con tal processo i microrganismi appaiono colorati in verde, i nuclei e i nucleoli in rosso e le granulazioni protoplasmatiche in rosso egualmente; se poi il liquido è molto albuminoso, anche il fondo della preparazione appare leggermente tinto in roseo.

Colorazione delle spore.

Fino ad ora le spore si distinguevano e si riconoscevano per la loro proprietà negativa di rimanere incolore, sotto l'aspetto di

corpicciuoli lucenti, in presenza delle ordinarie soluzioni dei colori d'anilina, i quali invece servono assai bene per colorare il corpo dei bacilli. Ora però si è riuscito a colorare anche le spore, applicando anzi per ciò un processo di *colorazione doppia*, che serve assai bene per fare spiccare il colorito delle spore in contrasto con quello dei bacilli.

Il Koch (1), nel colorare i bacilli tubercolari colla soluzione di bleu di metilene nell'acqua d'anilina, osservò che le spore di un grosso bacillo si tingevano in bleu e mantenevano questo colore anche in presenza della vesuvina, la quale invece tingeva in bruno gli stessi bacilli.

Ma la colorazione doppia delle spore è stata proposta ed applicata anzitutto dal Dr. Arning nel laboratorio del Cohn a Breslavia. L'Arning ha usato per la prima colorazione (spore) la fucsina sciolta nell'acqua d'anilina, e per la seconda il bleu di metilene: quest'ultimo scaccia il colore rosso dal plasma dei bacilli, mentre le spore rimangono colorate d'un bel roseo.

Lo stesso processo è stato messo in pratica anche dal Neisser; ed il Bienstock (2) e il Van Ermengem (3) hanno ottenuto eguali risultati per la colorazione doppia delle spore, usando il processo Koch-Erlich che serve per la ricerca dei bacilli tubercolari.

Il Buchner (4) ha poi descritto un altro metodo di colorazione delle spore che è il seguente. Il Buchner, partendo dal fatto che i bacilli viventi non si colorano, e uccisi invece col disseccamento si combinano subito coi colori d'anilina, ha supposto che la non colorabilità delle spore fosse parimenti dovuta ad una proprietà inerente alla vita delle stesse, e precisa-

---

(1) Koch, Mitth. a. d. kais. Ges., Bd. II, fig. 23.

(2) Bienstock, Zeitschrift für Klin. Med., 1884, pag. 1.

(3) Van Ermengem, Bulletin des Séances de la Société de Microscopie Belge, Anno XI, N. 3, 1885, pag. 92.

(4) Buchner, *Ueber das Verhalten der Spaltpilz-Sporen zu den Anilinfarben*, Aertzliches Intelligenzblatt, 1884, No. 33, pag. 370.

mente alla resistenza che offre la membrana che le avvolge ad essere attraversata da qualsiasi sostanza. Egli pensò allora, per rendere la membrana permeabile alle materie coloranti, di uccidere le spore, sia esponendole ad una temperatura elevata, sia facendo agire su quelle gli acidi minerali concentrati.

Il Buchner ha fatto le prove sulle spore del « bacillus subtilis », facendone preparati sui coproggetti e sottoponendoli per 1/2-1 ora a 210° C. nella stufa ad aria calda, oppure per 1 ora a 120° C. nel vapor d'acqua, o finalmente immergendoli per 15 secondi in una soluzione concentrata di acido solforico inglese e lavandoli quindi accuratamente coll'acqua distillata. — Si può raggiungere lo stesso intento con tutti gli altri mezzi che servono ad uccidere questi elementi, come sarebbe ad esempio una soluzione concentrata di potassa, che si lascia agire lungo tempo.

Se i preparati, trattati in tal guisa, s'immergono in una soluzione di uno dei soliti colori d'anilina (il bleu di metilene serve meglio di tutti), si ottiene la colorazione isolata delle spore, mentre i bacilli non si colorano affatto. Si può però ottenere anche la colorazione di questi ultimi ed avere la colorazione doppia di contrasto, esponendo i preparati ad un grado tale di calore, che sia sufficiente ad uccidere le spore senza distruggere l'affinità che hanno i bacilli pei colori d'anilina. Per quel che riguarda la mia esperienza personale sul proposito, ho potuto osservare che, dopo avere fatto passare attraverso la fiamma per 6-7 volte consecutive i preparati di « bacillus epidermidis » contenenti spore, si ottiene bene la colorazione doppia delle spore e dei bacilli, sottoponendo prima i preparati all'azione della fucsina sciolta nell'acqua d'anilina, e successivamente a quella d'una soluzione di bleu di metilene. Le spore appaiono tinte in roseo ed i bacilli in bleu. Si può usare anche per lo stesso scopo il metodo di Neisser, che consiste nel colorare dapprima i preparati per un'ora nella soluzione riscaldata di fucsina nell'acqua d'anilina, decolorare quindi coll'acido nitrico e colorare successivamente col bleu di metilene.

Il metodo della colorazione delle spore può anche servire

come mezzo ausiliario per studiare il valore dei disinfettanti, essendo un criterio atto a stabilire se le spore sono ancora in vita oppure no.

Metodi di colorazione speciali.

Questi esposti finora sono i principali metodi di colorazione che ho chiamato « generali », perchè si può dire che servono per tutti i microparassiti che si conoscono. Le poche eccezioni che prima esistevano a questo riguardo, col moltiplicarsi delle ricerche vanno ora a mano a mano scomparendo, come si è già accennato a proposito dei bacilli tubercolari; cosicchè io credo che non si possa più oggimai attribuire ai metodi di colorazione differenziali, cosidetti *specifici*, quel valore diagnostico assoluto che alcuni volevano. È noto infatti che, secondo il periodo di sviluppo dei microrganismi, come anche secondo il processo di indurimento dei tessuti che li contengono e la sua durata, può una stessa specie comportarsi colle materie coloranti in maniera tanto diversa, che il valore diagnostico differenziale di siffatte proprietà dev'essere posto in dubbio seriamente.

Tuttavia esistono alcuni processi che possono dirsi *speciali*, inquantochè riescono adatti, a preferenza di quelli ordinari, per la dimostrazione di certi microparassiti, i quali hanno pure qualche cosa di particolare nel modo di comportarsi di fronte all'azione delle sostanze coloranti. Questo vale specialmente pei bacilli della tubercolosi, per la colorazione dei quali è stato proposto un numero grande di metodi, di cui adesso esporrò i principali, facendo la scelta di quelli che offrono sui primitivi qualche reale vantaggio, sia per la sicurezza e facilità, come per la pronta esecuzione degli stessi.

Metodi di colorazione dei bacilli tubercolari.

A) Metodo di Koch — Il metodo primitivo, al quale si deve la scoperta del bacillo tubercolare, si può dire che

ormai non ha più che un valore storico, dal momento che lo stesso Koch ha poi accettato la modificazione introdotta dall'Ehrlich, ritenendola migliore. Il processo, quale trovasi descritto nella prima memoria del Koch sulla eziologia della tubercolosi (1), consiste nel colorare dapprima i preparati, sia quelli di sezioni come quelli di sputo essiccato sui vetrini coproggetti, con una soluzione acquosa alcalina di bleu di metilene così preparata: si mescolano 1 ccm. di soluzione alcoolica concentrata di questa sostanza con 200 ccm. di acqua distillata, agitando ripetutamente, e vi si unisce, agitando sempre, 0,2 ccm. di una soluzione di potassa caustica al 10 %. I preparati da colorarsi si tengono in questa miscela da 20-24 ore, oppure si abbrevia il tempo di colorazione fino a $^1/_2$-1 ora riscaldando il liquido a bagno-maria a 40° C. Sui coproggetti così colorati si versa qualche goccia di soluzione acquosa concentrata di vesuvina, precedentemente filtrata, si lavano dopo 1-2 minuti coll'acqua distillata e si osservano quindi direttamente al microscopio. La vesuvina scaccia il primitivo colore bleu da tutti gli elementi del preparato, comprese le altre forme accidentali di microbi, eccetto che dai bacilli tubercolari, i quali spiccano pel loro colorito azzurro sul fondo bruno del campo microscopico. — I soli bacilli della lebbra si comportano, colorati in tal guisa, come quelli della tubercolosi.

Se si tratta di sezioni, si opera egualmente; è necessario soltanto, dopo averle estratte dalla soluzione bleu, di tenerle in quella di vesuvina per 15-20 minuti e lavarle quindi con acqua, finchè sia scomparsa qualsiasi traccia di colore bleu, rimanendo una colorazione bruna più o meno intensa. Si disidratano poi nell'alcool assoluto, si rischiarano coll'olio di garofani e si osservano in questo liquido al microscopio, oppure si chiudono nel balsamo o nella damar.

Il Koch soggiunge che è indifferente usare invece del bleu di metilene altri colori d'anilina (fatta eccezione dai colori bruni),

---

(1) Koch, Lavoro citato.

ma ritiene indispensabile l'aggiunta di un alcali al liquido di colorazione, il quale, se acido o neutro, non servirebbe a colorare quei bacilli specifici.

In seguito, come ho detto, lo stesso Koch ha adoperato la modificazione proposta dall'Ehrlich, modificando però a sua volta alquanto il processo di quest'ultimo nella maniera che è esposta in appresso.

B) Metodo di Ehrlich (1) — Sono due i punti essenziali della modificazione portata da quest'autore al metodo anzidescritto: anzitutto egli usa per rendere alcalina la soluzione colorante (la quale può essere di genziana, di violetto di metile o di fucsina), invece della potassa, un'altra base alcalina che è la *fenilamina* o *anilina*, detta anche *olio d'anilina* per la sua consistenza oleosa. In secondo luogo poi, prima di dare al fondo del preparato la colorazione di contrasto, lo decolora cogli acidi minerali concentrati, i quali tolgono il colore a tutti gli elementi dei tessuti e agli altri microrganismi (anche qui fatta eccezione dai bacilli della lebbra), lasciandolo invece intatto ai bacilli tubercolari. Le basi fondamentali del processo di colorazione, che chiameremo di Koch-Ehrlich, sono adunque le seguenti:

a) Lunga durata dell'azione della sostanza colorante, se l'operazione si fa alla temperatura dell'ambiente; giacchè mentre gli altri microrganismi si colorano rapidamente, quelli della tubercolosi abbisognano di un tempo molto maggiore, tanto che di questa proprietà il Baumgarten consiglia di valersi come di un criterio differenziale.

b) Colorazione con una delle tre sostanze d'anilina anzidette, sciolta nell'acqua alcalinizzata fino a saturazione coll'olio d'anilina.

c) Decolorazione rapida con una soluzione concentrata, acquosa od alcoolica, di acido nitrico od idroclorico.

---

(1) Ehrlich, Comunicazione fatta alla « Verein f. inn. Medicin » di Berlino il 1° maggio 1882, e riprodotta poi nella « Berliner klinische Wochenschrift, » 6 maggio 1882.

d) Finalmente, per facilitare l'osservazione microscopica e per potere osservare i rapporti che hanno gli elementi specifici tubercolari coi componenti anatomici dei tessuti, colorazione successiva dei nuclei e dei detritus cellulari con un'altra sostanza colorante, che faccia contrasto, più che si può, colla prima adoperata.

Quanto alle particolarità del processo, si comincia dal preparare sul coproggetti, trattandosi di esaminare lo sputo, uno strato sottile di questo materiale, schiacciando una piccola porzione delle masse giallastre, più dense, dello sputo stesso fra due vetrini compressi fra il pollice e l'indice, in modo da ottenere su ciascuno di questi uno straterello uniforme. Si lascia disseccare all'aria, si fissa facendolo passare due o tre volte lentamente sulla fiamma ad alcool, oppure riscaldandolo per un'ora a 100-110° C. nella stufa a secco o sul tavolino dell'Ehrlich, e si fa quindi sopranuotare colla superficie disseccata sul liquido colorante, contenuto in un vetro da orologio, lasciandovelo per circa 24 ore.

La soluzione colorante di fucsina, di genziana, di dahlia, o di violetto di metile (quest'ultimo sembra essere il più adatto) si può preparare in varii modi. Si può, come consiglia il Friedländer (1), fare una soluzione satura di olio di anilina commerciale (giallo scuro), scuotendo ripetutamente 4 ccm. di questa sostanza con 100 ccm. di acqua distillata, in modo da ottenerne una soluzione satura: questo si ottiene in una mezz'ora circa, dopo di che si filtra e si versa il filtrato, *limpido* e *trasparente*, in una bottiglietta di vetro che contenga due dita trasverse circa di violetto di genziana polverizzato. Si agita di quando in quando, e dopo un giorno si ha pronta una soluzione satura di genziana nell'acqua d'anilina *(Anilinwasser)* della quale, quando si vuole adoperare, si filtra una certa quantità in un vetrino da orologio. Si può anche mescolare, come consiglia il Weigert,

(1) Friedlaender, Opera citata, p. 49.

3 grammi di olio d'anilina con 15 gr. d'alcool assoluto, sciogliervi in un mortaio 1 gr. od 1,5 gr. di genziana polverizzata e mescolare la soluzione con 85 ccm. di acqua distillata e sterilizzata. Questa soluzione si può usare anche senza filtrarla. Più comodo e più spiccio ancora si è di tenere pronta una soluzione alcoolica satura di sostanza colorante, la quale se è al riparo dalla luce si mantiene inalterata per mesi, preparare come al solito 100 ccm. di acqua d'anilina e versarvi dentro la detta soluzione a goccia a goccia, finchè si vede comparire un intorbidamento, oppure aggiungervene direttamente 5-6 ccm.

Comunque sia preparato il liquido colorante, siccome si alterano facilmente tanto la materia colorante quanto l'olio d'anilina, è regola generale di prepararne volta per volta piccole quantità, e di tenerlo in bottiglie nere o ravvolte con carta verniciata pure di nero. Se la soluzione è fatta col metodo primo descritto, è bene aggiungervi $^1/_{10}$ del volume di alcool assoluto che serve a mantenerla più a lungo. Per essere sicuro del potere colorante del liquido che adopero, io uso tenere preparata una certa quantità di acqua d'anilina soprasatura, ne filtro volta per volta un 10-20 ccm. e vi aggiungo 15-30 goccie di soluzione alcoolica satura di materia colorante.

È sempre buona regola filtrare il liquido prima di adoperarlo. Nel liquido filtrato si tengono i preparati, sieno secchi sui coproggetti, sieno di sezioni, per 20-24 ore, si lavano quindi nell'acqua distillata e si decolorano nell'acido azotico officinale, diluito con 2 volte il suo volume di acqua (33 $^1/_3$ $^0/_0$). In questo non si devono tenere che pochi secondi (pei vetrini basta immergerli semplicemente 1 o 2 volte) e si devono quindi lavare subito nell'alcool, altrimenti anche i bacilli tubercolari perdono il loro colorito. È questo il momento più delicato dell'operazione, perchè se l'azione dell'acido si prolunga un poco al di là del necessario, si decolora ogni cosa. Questo fatto capita spesso finchè non si è acquistata una pratica sufficiente, per cui ora giustamente si consiglia di fare la soluzione dell'acido più diluita, giacchè così si può lasciare agire più a lungo senza pericolo. Il Friedländer

consiglia di mescolare 3 parti di acido con 100 di alcool, e lasciarvi i preparati per 3-5 minuti. Si può anche usare ugualmente bene, invece dell'acido nitrico, l'acido cloroidrico in soluzione concentrata di 1 : 3 di acqua.

Una volta decolorati, se si tratta di liquidi distesi sui coproggetti, si lavano con acqua e si osservano pure in una goccia di acqua direttamente al microscopio: se sono sezioni e si vogliono conservare, si lavano ripetutamente nell'acqua, o meglio nell'alcool al 60 °/₀, per togliere qualsiasi traccia di acidità, e si disidratano quindi coll'alcool assoluto.

A questo punto o si rischiara il preparato con un olio essenziale e si esamina in questo al microscopio, o si chiude in balsamo; oppure, se si vuole la colorazione doppia, come è sempre preferibile per dare ai nuclei ed al fondo del preparato una tinta uniforme che fa risaltare vieppiù l'immagine dei microrganismi, si usa un'altra soluzione colorante, diversa secondo la tinta usata per la colorazione dei bacilli. Se questa era rossa (fucsina), si userà il bleu di metilene o il verde di metile, se era violetta, si userà il bruno di Bismarck o la vesuvina, e se finalmente era bleu, il carmino alluminato di Grenacker. Bisogna badare però a che la colorazione dei nuclei non sia troppo intensa e non copra l'imagine dei bacilli tubercolari; si usano perciò soluzioni tenui (1-2 °/₀), e si lasciano agire per poco tempo (2-5 minuti).

Volendo conservare i preparati, questi si disidratano di nuovo nell'alcool, si rischiarano coll'olio di cedro o di bergamotto, anzichè con quello di garofani che ha grande affinità pei colori d'anilina, e si chiudono in balsamo o in damar. Queste sostanze devono essere sciolte non già nel cloroformio, ma nell'olio di trementina o meglio nel xilolo o nella benzina, la quale serve a fissare la colorazione fatta coi sali d'anilina. Con tutto questo i preparati di bacilli tubercolari si conservano assai difficilmente; pare tuttavia che rinchiusi nel balsamo secco sciolto col calore, e tenendoli lungi dall'azione della luce, si conservino più a lungo.

I vantaggi del metodo di Ehrlich consistono essenzialmente

in ciò che l'anilina altera gli elementi meno che l'alcali usato prima dal Koch, e si ottengono così i bacilli specifici più fortemente colorati, e quindi più grossi ed appariscenti che col metodo primitivo; tanto che, mentre prima per osservarli era indispensabile l'apparecchio di Abbe, colla modificazione dell'Ehrlich si vedono già, come finissimi bastoncini, a 300 diam. di ingrandimento e senza alcuno apparecchio speciale d'illuminazione. Vi sono tuttavia anche in questo metodo alcuni inconvenienti, quali sarebbero la facile decolorabilità, se si tengono troppo a lungo in contatto coll'acido, e il rimanere sempre scolorito qualche bacillo. Ad ogni modo però, malgrado tutte le varianti proposte successivamente, rimane sempre *il processo più delicato e più sicuro per la diagnosi differenziale dei bacilli tubercolari.*

Il Koch usa ora anch'esso questo processo, leggermente modificato come segue (1):

a) Si prepara la soluzione colorante aggiungendo a 100 ccm. di acqua d'anilina, preparata come sopra, 11 ccm. di soluzione alcoolica satura di genziana, o di violetto di metile, o di fucsina (la quale serve meglio per i preparati da conservarsi) e 10 ccm. di alcool assoluto. — Tale soluzione si mantiene sicuramente atta alla colorazione per circa 10 giorni.

b) Le sezioni si lasciano in questa soluzione almeno 12 ore; i preparati sui coproggetti si lasciano 10 minuti nel liquido riscaldato a 50°.

c) Si immergono successivamente nell'acido nitrico *privo di acido nitroso,* diluito in 3-4 vol. di acqua, per pochi secondi, per 50″ tutt'al più.

d) Si lavano nell'alcool al 60 °/₀ per pochi minuti (i vetrini basta immergerveli 2 o 3 volte).

e) Si colorano di nuovo per qualche minuto con una so-

---

(1) Koch, *Die Aetiologie der Tuberculose,* Mittheilungen aus dem kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. II, 1884.

luzione diluita di vesuvina o di bleu di metilene (se prima si è usata la fucsina).

f) Si lavano di nuovo nell'alcool al 60 %, si disidratano nell'alcool assoluto e si rischiarano coll'olio di cedro o di trementina.

g) Si osservano direttamente al microscopio in una goccia di olio essenziale, con un ingrandimento dai 6-700 diam. e coll'apparecchio di Abbe senza diaframmi.

h) Finalmente, se si vogliono conservare, si chiudono nel balsamo sciolto nella trementina.

Per stabilire un tal metodo l'Ehrlich è partito dal duplice supposto che i bacilli, i quali, secondo il Koch, si colorano nelle soluzioni alcaline dei colori basici d'anilina e non in quelle neutre od acide, sieno circondati da un involucro (Hülle), permeabile per gli alcali solamente, e che il medesimo non sia permeabile neanche per gli acidi forti minerali; per cui quando questi agiscono sul preparato uniformemente colorito, tolgono il colore a tutti gli altri elementi, eccetto che ai bacilli specifici, i quali risaltano in tal guisa sul resto del campo microscopico incoloro.

L'esattezza di queste ipotesi è stata dimostrata nulla dalle ricerche posteriori, le quali hanno dimostrato invece che nel processo Koch-Ehrlich non v'ha niente di assoluto e di essenziale (specifico), come prima si credeva. Non la reazione alcalina del liquido colorante, giacchè lo Ziehl (1) è riuscito a colorare questi bacilli anche aggiungendo al liquido stesso una sostanza acida, quale il fenolo, l'acido pirogallico e la resorcina; ed il Lichtheim (2), il De Giacomi (3), il Prior (4), ed il Petri (5) hanno dimostrato che bastano le semplici soluzioni dei colori basici d'anilina, senza alcuna aggiunta nè di alcali nè di acido, per ottenere la voluta colorazione. Recentemente poi il Baumgarten (6) con nuove ricerche è giunto alla conclusione, che non solo quei bacilli si colorano nelle semplici soluzioni anzidette senza alcuna aggiunta, ma che neppure è necessaria per renderli manifesti la successiva decolorazione cogli acidi forti, anche quando si tratti di preparati di sezioni. Egli ha mostrato inoltre che la colorazione doppia, la quale serve pure a differenziare i bacilli tubercolari dagli altri microrga-

---

(1) Ziehl, *Zur Färbung des Tuberkelbacillus*, Deutsche med. Wochenschrift, 1882, No. 33.
(2) Lichtheim, *Zur diagnostische Verwerthung der Tuberkelbacillen*, Fortschr. der Med., 1883, No. 1.
(3) De Giacomi, Ibid., 1883, No. 5.
(4) Prior, Berl. klin. Wochenschr., 1883, No. 33.
(5) Petri, Ibid., 1883, No. 48.
(6) Baumgarten, *Beiträge zur Darstellungsmethode der Tuberkelbacillen*, Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie, Bd. I. Heft I, 1883.

nismi, si può ottenere egualmente senza aggiunta di alcali e senza successiva decolorazione cogli acidi minerali.

Quest'ultima conclusione, che dimostra che nulla v'ha di specifico nella colorazione nè di questi nè degli altri microparassiti, oltre un grande interesse teorico, ha pure importanza dal lato pratico, poichè col metodo di colorazione semplice, senza uso di acidi, proposto dal Baumgarten, rimangono colorati oltre i bacilli del Koch anche altri microrganismi, che possono a lato di questi trovarsi nei tessuti tubercolari. Quanto sia importante questo fatto lo dimostrano le ricerche recenti dello stesso Koch, il quale ha trovato nell'interno dello spessore delle caverne polmonari, oltre il bacillo specifico, anche una specie di micrococco *patogeno* (micrococcus tetragonus), la cui entità per la genesi del processo distruttivo polmonare non è ancora stabilita.

Con tutto questo però nè i metodi più semplici del Baumgarten nè qualsiasi altro finora proposto può sostituire, anche a giudizio di quest'ultimo autore, il metodo di Koch-Ehrlich, quando si tratti di stabilire un *diagnostico differenziale sicuro ed esatto.* Si preferirà invece il metodo della colorazione (semplice o doppia) coi soli colori d'anilina, senza decolorazione cogli acidi nè aggiunta di alcali, allorquando, dopo avere stabilito il diagnostico, si vogliano in pari tempo *studiare certe particolarità istologiche delicate dei tessuti* (es. la cariocinesi), *oppure si voglia ricercare se insieme coi bacilli tubercolari esiste qualche altra specie di microrganismi.*

Tuttavia anche il valore diagnostico della colorazione Koch-Ehrlich non è assoluto, giacchè vi sono i bacilli della lebbra che si comportano anch'essi ugualmente di fronte all'azione degli stessi reagenti. Il Lichtheim, il Babes, il Petri e il De-Giacomi (1) asseriscono inoltre che anche altre forme di microbi si colorano collo stesso processo. Delle sostanze coloranti la più adatta è il violetto di metile, il quale in soluzione nell'acqua d'anilina dà le più belle colorazioni dei bacilli tubercolari.

I pezzi da sezionare devono essere induriti nell'alcool assoluto, oppure prima nella-soluzione di Müller e quindi nell'alcool (2).

(1) Lavori citati.

(2) Il Baumgarten asserisce che l'induramento nel liquido di Müller non altera per nulla la colorabilità dei bacilli tubercolari.

L'acido cromico rende più difficile ed incompleta la colorazione, per cui si consiglia di non usarlo se non quando si vuole in pari tempo fissare certe apparenze delicate di struttura, come sarebbe la scissione nucleare. L'esame dei preparati si può fare anche con ingrandimenti mediocri (3-400 diametri), senza che sia indispensabile l'apparecchio d'illuminazione: nei casi dubbî però, quando il numero dei bacilli è scarso, bisogna usare forti ingrandimenti (600 diam.), l'immersione omogenea e l'apparecchio di Abbe.

Al metodo di Ehrlich si sono fatte dai singoli osservatori innumerevoli modificazioni, la maggior parte delle quali però sono di semplice dettaglio e quindi di poca importanza. Così taluni hanno usato come decolorante l'acido nitrico puro (1), altri (2) consigliano di adoperare una sostanza colorante preparata sempre estemporaneamente, sciogliendo 1 gr. di violetto di genziana in 50 gr. d'acqua di anilina; altri finalmente, invece dell'acido nitrico mescolato coll'acqua, adoperano un miscuglio di acido nitrico e di alcool (due goccie d'acido che segni 1,087 in un vetro da orologio pieno a metà di alcool).

Si sono pure proposte alcune modificazioni importanti, di cui le principali sono le seguenti.

1° *Modificazione del* Rindfleisch (3). — È questo un miglioramento notevole per la maggiore rapidità che si ottiene nel processo, mediante il riscaldamento del liquido colorante. Si può a tale scopo riscaldare direttamente sulla fiamma d'alcool il vetro da orologio che contiene la soluzione, finchè se se ne vedono svolgere i vapori, come consiglia il Rindfleisch; oppure, come vuole il Koch, riscaldarlo fino a 50° C. in una stufa o nel bagno maria. Basta allora un breve soggiorno del preparato (10-15 minuti) in questo liquido per ottenere la colorazione. Nel resto si segue il processo Koch-Ehrlich. Questo metodo è raccomandabile specialmente pei preparati sui coproggetti, ma non lo è altrettanto per le sezioni.

2° *Modificazione del* Weigert. — Consiste nell'usare, invece della soluzione di genziana nell'olio d'anilina, un liquido così composto: 90 gr. di acqua distillata, 10 gr. di alcool assoluto, 0,5 gr. di ammoniaca e 2 gr. di violetto di genziana si mescolano insieme e si filtrano. Il trattamento suc-

---

(1) Guttmann, *Ueber den Nachweiss der Tuberkelbacillen und ihr Vorkommen in den phtisischen Sputis*, Verhandl. d. med. Gesellschaft, Berl. klin. Wochenschr., 1882, p. 789.

(2) Balmer und Fraenkel, *Ueber das Verhalten der Tuberkelbacillen im Auswurfe während das Verlauf der Lungenschwindsucht*, Berl. klin. Wochenschr., 1882, No. 45, p. 679.

(3) Rindfleisch, *Ueber Tuberkelbacillen*, Sitzungsber. d. phys. med. Gesellsch. Würzburg, 1884, No. 8.

cessivo dei preparati è lo stesso anzidescritto. Il Plaut (1) dice essere questo il metodo migliore, perchè rende visibili nelle sezioni anche i bacilli che restano isolati, sparsi qua e colà; lo raccomanda perciò nelle ricerche della tubercolosi dell'uomo e del vitello.

3° *Modificazione del* Van Ermengem (2). — Per avere nel liquido colorante alcalinizzato una quantità più grande d'olio d'anilina che in quello preparato come d'ordinario, il Van Ermengem approfitta della maggiore solubilità di quella sostanza nell'alcool: scioglie quindi anzitutto la sostanza colorante in 40 ccm. di alcool assoluto, vi aggiunge 4 ccm. di olio d'anilina, mescola questa soluzione con egual volume di acqua distillata e filtra, preparando il liquido fresco volta per volta. I reattivi coloranti più stabili sarebbero, secondo lui, il solfato di rosanilina e il violetto di metile 5B; bisogna però sempre usare l'avvertenza di lavare bene con acqua i preparati decolorati coll'acido nitrico, per togliere qualsiasi traccia di quest'acido. Per la colorazione del fondo del preparato, il Van Ermengem consiglia la soluzione acquosa di bleu d'anilina o quella di vesuvina, o meglio ancora il carmino alluminato, fatto agire per 5-10 minuti, quando la colorazione dei bacilli è stata fatta col bleu di metilene o col verde di metile.

4° *Modificazione del* Fränkel (3). — *Serve per la doppia colorazione rapida dei preparati secchi degli sputi.* Il Fränkel, per preparare un'acqua d'anilina che si conservi e non abbia bisogno di essere filtrata, consiglia di sciogliere 3 ccm. d'olio di anilina o di toluidina (che è la sola che può sostituire l'anilina con eguale risultato) in 7 ccm. di alcool assoluto e di aggiungervi 90 ccm. di acqua distillata. Si prendono 5 ccm. di quest'acqua d'anilina, si riscaldano fino a 100° C. e vi si aggiunge a goccia a goccia una soluzione satura di fucsina o di violetto di metile, finchè ha preso un colorito intenso opalescente. I vetrini coproggetti si lasciano sopranuotare sul liquido così riscaldato per 2-3 minuti, ed anche meglio per 8-10 minuti. La decolorazione e la colorazione successiva del fondo del preparato si compiono contemporaneamente in uno stesso liquido, così composto: per i preparati coloriti colla fucsina serve una miscela formata da 50 parti di alcool, 30 di acqua e 40 di acido nitrico, a cui si aggiunge tanto bleu di metilene finchè se ne ottiene agitando una soluzione satura, e quindi si filtra; per quelli coloriti col violetto di metile, si usa una miscela di 70 parti di alcool e 30 di acido nitrico, saturata con vesuvina e filtrata. In queste soluzioni si lasciano i preparati per 1-2 minuti, si lavano con acqua o con alcool al 50 %, leggermente acidulati con acido acetico (1/2 %), e si osservano nell'acqua, oppure si lasciano disseccare e si conservano nel balsamo.

---

(1) Plaut, *Färbungs-Methoden zum Nachweis der Microorganismen*, Leipzig 1885.

(2) Van Ermengem, *Préparation des bactéries de la tuberculose, perfectionnements apportés à la méthode de double coloration*, Bull. des Séances de la Société belge de Microscopie, 29 juillet 1882, p. 151.

(3) B. Fraenkel, *Ueber die Färbung des Koch'schen Bacillus*, Berl. klin. Wochenschr., 1884, No. 13.

Questo metodo pure avendo tutti i vantaggi di quello di Koch-Ehrlich, è molto più spiccio e perciò raccomandabile per l'esame degli sputi.

5º *Metodo di* Neelsen. — Non è che una delle modificazioni proposte dallo Ziehl al metodo Koch-Ehrlich, nella quale all'olio d'anilina viene sostituito l'acido fenico: 1 gr. di fucsina si scioglie in 100 gr. di soluzione acquosa d'acido fenico al 5 % e vi si aggiungono 10 ccm. di alcool. I preparati sui coproggetti si colorano assai rapidamente in questo liquido riscaldato fino alla comparsa dei vapori; le sezioni vi si tengono 5-10 min. alla temperatura dell'ambiente. Si lavano in una soluzione acquosa d'acido solforico al 25 % e si colorano successivamente col bleu di metilene. Questo metodo, oltre la grande rapidità, ha pure il vantaggio che il liquido colorante si mantiene inalterato anche per mesi.

Passiamo ora ad esporre i metodi che si servono della colorazione semplice ordinaria coi colori d'anilina.

C) Mètodi del Baumgarten. — *Il metodo antico* (1), che ha servito a quest'autore per iscoprire il bacillo tubercolare contemporaneamente quasi col Koch, riposa sulla proprietà che hanno i microbi di resistere all'azione dissolvente degli alcali (potassa caustica), più degli elementi organici dei tessuti. Per gli sputi ha proposto il seguente metodo di ricerca, che direi quasi «negativo». I preparati sui coproggetti, fatti e disseccati come d'ordinario, si tengono per pochi momenti in una soluzione allungata di potassa caustica (1-2 goccie di soluzione al 33 % in un vetro da orologio pieno d'acqua); dopodichè, se si osservano al microscopio a 4-500 diam. d'ingrandimento, si possono già vedere chiaramente i bacilli tubercolari, per la loro apparenza più grossa e più voluminosa di quella che hanno dopo la colorazione colle sostanze d'anilina. Per differenziarli però dai bacilli ordinari, si fa disseccare nuovamente il vetrino all'aria, si fa passare 2-3 volte attraverso la fiamma e vi si versa sopra una goccia di soluzione allungata di violetto o d'inchiostro di anilina. Con questo processo tutti i microbi si colorano subitamente in violetto, fatta eccezione da quelli tubercolari che rimangono incolori. Un tal pro-

---

(1) Baumgarten, *Ueber ein bequemes Verfahren Tuberkelbacillen in Sputis nachzuweisen*, Centralblatt f. d. med. Wissenschaften, 1882, No. 25. — *Tuberkelbacterien*, Ibid., No. 15 e 19, 1882.

cesso si raccomanda specialmente nella pratica ordinaria per la sua brevità (10 minuti), ed anche perchè è un metodo differenziale abbastanza sicuro, fondato sulla proprietà che hanno i bacilli della tubercolosi di colorarsi *più lentamente di tutti gli altri*, compresi in ciò anche gli stessi bacilli della lebbra.

I metodi recenti del Baumgarten (1) si riferiscono tanto alla colorazione semplice che a quella doppia, fatte però coi colori di anilina senza aggiunta di alcali nè di altre sostanze, e senza decolorazione cogli acidi.

Colorazione semplice. — Le sezioni di tessuti, induriti nell'alcool o nel liquido di Müller, si tengono immerse per 12-24 ore in una soluzione alcoolica di violetto di metile molto diluita, che si prepara *ex tempore* versando 4-5 goccie di soluzione alcoolica satura in un piccolo vetrino da orologio pieno di acqua distillata. Si lavano quindi nell'acqua, si decolorano per 5-10 minuti nell'alcool assoluto, si rischiarano coll'olio di garofani e si chiudono immediatamente in una miscela a parti eguali di balsamo (senza cloroformio) e di olio di garofani. I bacilli tubercolari, osservati coll'obbiettivo $^1/_{12}$ Zeiss immersione omogenea e col condensatore di Abbe senza diaframma, appaiono coloriti in violetto scuro sul fondo del preparato che ha un colore violetto pallido. A lato di questi si colorano anche le altre specie di bacilli, i quali però si possono differenziare dai primi per ciò che, *tenuti a contatto dell'olio di garofani, conservano il loro colorito per giorni e settimane inalterato, mentre i bacilli tubercolari lo perdono in poche ore.*

Si può ottenere anche la colorazione isolata di questi ultimi, ponendo per 5 minuti i preparati, prima di decolorarli nell'alcool, in *una soluzione di carbonato di potassa satura per metà*, la quale fa sì che l'alcool tolga quindi quasi completamente il colore ai tessuti.

Come pel metodo Koch-Ehrlich, anche qui si può abbre-

---

(1) Baumgarten, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie, Bd. I, p. 52.

viare il tempo dell'operazione fino a 10-20 minuti, riscaldando il liquido a 50° C. (Koch) a bagno maria, oppure sulla fiamma ad alcool (Rindfleisch) finchè si svolgono vapori visibili. Anche con questo metodo, se si usano gli acidi minerali concentrati, questi decolorano i tessuti lasciando colorati i bacilli specifici.

Colorazione doppia. — Dopo avere colorito le sezioni colla soluzione di violetto di metile, come sopra, si decolorano nell'alcool assoluto per 5 minuti, e quindi si immergono per 15-20 minuti in una soluzione acquosa concentrata di bruno di Bismarck, semplice o contenente 1 $^0/_0$ di acido acetico (preferibile); si disidratano quindi per 5 minuti coll'alcool assoluto e si trattano successivamente come di solito. I bacilli spiccano pel loro colorito violetto intenso sul resto del campo microscopico colorato in bruno. Questa sarebbe veramente una reazione caratteristica ed avente un valore differenziale sicuro come quella di Koch-Ehrlich, giacchè il Baumgarten asserisce di aver trovato che *tutte le altre specie di bacilli, trattati ugualmente, perdono il colore violetto e si colorano in bruno come il resto del preparato* (1).

Si può anche usare con risultato quasi eguale il violetto di genziana, per quanto però la colorazione riesca sempre meno intensa che col violetto di metile. La fucsina è invece poco adatta a tal processo. Se si adoperano in luogo delle soluzioni alcooliche allungate le soluzioni acquose semplici, si ottiene egualmente la colorazione, ma non così intensa.

Per la colorazione dei *preparati essiccati sui vetrini coproggetti* il processo non cambia; è soltanto più breve il tempo necessario a che i bacilli si colorino, giacchè, usando soluzioni un po' più concentrate, si può alla temperatura dell'ambiente averli colorati in $^1/_2$-1 ora, e riscaldando il liquido a 50° C., in 5 minuti. Per avere la colorazione doppia, si lasciano nell'alcool 1 minuto soltanto, e 5 minuti nella soluzione di bruno di Bismarck o di vesuvina; si lavano con acqua distillata, si fanno disseccare e si chiudono nella miscela di balsamo e olio di garofani (2).

---

(1) L'A. non dichiara in particolare se anche i bacilli della lebbra, i quali, come è noto, si comportano egualmente dei tubercolari cogli altri metodi di colorazione, reagiscono in questo caso diversamente come gli altri microrganismi.

(2) Non so comprendere il motivo per cui l'A. consiglia l'olio di garofani per conservare i preparati, mentre secondo l'esperienza comune quest'olio toglie rapidamente il colore ai bacilli tubercolari.

Dei vantaggi ed inconvenienti, che offre questo metodo in confronto di quello di Koch-Ehrlich, ho già parlato: aggiungerò solamente che la colorazione doppia differenziale del Baumgarten esige sempre un tempo maggiore, e quindi a me sembra che il valore della stessa sia essenzialmente teorico, e serva soltanto a dimostrare che nulla havvi di specifico nè in questo, nè in alcun altro metodo di colorazione dei microparassiti. Concludiamo adunque che le differenze che distinguono i bacilli tubercolari da tutti gli altri, anzichè qualitative, sono semplicemente di quantità e consistono in ciò che gli stessi *si colorano più lentamente, più difficilmente e più durevolmente di tutti.*

Colorazione dei bacilli della lebbra.

Come appendice ai metodi di colorazione dei bacilli tubercolari, è necessario dire ancora qualche cosa del modo di differenziare questi microparassiti da quelli della lebbra, i quali hanno proprietà morfologiche pressochè uguali e si comportano anche ugualmente verso i reattivi coloranti.

Lasciando da parte per ora le differenze che esistono fra le due specie di bacilli relativamente alla forma e alla disposizione loro nei tessuti, e specialmente riguardo alle proprietà biologiche di ciascuno (v. Cap. VIII), vediamo intanto se è possibile distinguerli anche coll'aiuto dei soli mezzi di colorazione. Il Koch avendo trovato che i bacilli della lebbra, trattati col suo metodo speciale, si colorano ugualmente che quelli tubercolari, avea pure affermato che i primi, come tutti gli altri microbi, si colorano anche colle soluzioni semplici di anilina, mentre quelli della tubercolosi si rendono manifesti soltanto col processo specifico sopradescritto. Questo carattere differenziale è stato però dalle osservazioni successive dimostrato inesatto, per cui pareva che si dovesse rinunciare a distinguere con tal mezzo le due forme di bacilli, quando il Baumgarten (1) è riuscito a stabilire un metodo di *colorazione differenziale*, basato sulla proprietà che

---

(1) Baumgarten, *Ueber Untersuchungsmethoden zur Unterscheidung von Lepra-und Tuberkel-Bacillen,* Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie, Bd. 1, Heft 3, p. 367, 1884.

hanno i bacilli della lebbra di colorarsi *più facilmente ed in minor tempo* di quelli tubercolari, di tenere cioè a tal riguardo un posto di mezzo fra questi ultimi e il resto dei microrganismi. Io stesso ho avuto occasione di provare ripetutamente l'esattezza di questo fatto, e raccomando quindi il processo anche perchè è semplice e spiccio abbastanza.

Si prepara una soluzione alcoolica diluita di fucsina, aggiungendo 5-6 goccie della soluzione alcoolica satura in un piccolo vetrino da orologio pieno d'acqua; vi si lasciano sopranuotare i preparati fatti sui portoggetti per 6-7 minuti (le sezioni vi si tengono immerse per 12-15 minuti), e si decolorano per $^1/_4$ di minuto (le sezioni $^1/_2$ minuto) in un miscuglio di alcool e di acido nitrico puro, nella proporzione di 1 di acido su 10 di alcool. Si lavano quindi ripetutamente nell'acqua distillata, per togliere qualsiasi traccia di acido, si immergono per qualche minuto in una soluzione acquosa di bleu di metilene, si lavano di nuovo e si esaminano nell'acqua (le sezioni si disidratano nell'alcool assoluto e si rischiarano *coll'olio di bergamotto*, e non coll'olio di garofani che toglie il colore ai bacilli della lebbra, quando questi sono stati colorati rapidamente). I bacilli della lebbra appaiono colorati in rosso sul fondo bleu, mentre quelli tubercolari, nello stesso tempo e con un simile trattamento, non si sarebbero ancora colorati.

Anche il violetto di genziana o quello di metile dànno gli stessi risultati della fucsina, ma è sempre preferibile quest'ultima sostanza, giacchè è la migliore di tutte per la colorazione dei bacilli della lebbra, come lo è il violetto di metile per quelli della tubercolosi.

Particolarità della colorazione di altri microparassiti.

Gli altri microrganismi patogeni, per quanto si colorino tutti coi metodi generali suesposti, offrono tuttavia qualche particolarità, relativa alle condizioni che sono più favorevoli per la colorazione di ciascuno. Quindi allorchè si devono ricercare nei

tessuti o nei succhi dell'organismo animale, è necessario introdurre nei metodi di esame generali qualche piccola variante, che è bene conoscere per riuscire più facilmente nello intento.

Bacilli tifosi di Eberth. — Si colorano un po' più difficilmente degli altri microbi, e prima anzi si credeva che bastasse l'indurimento dei tessuti nell'alcool per distruggere l'affinità di questi elementi pei colori d'anilina. Recentemente però il Friedländer ha osservato che si colorano facilmente nelle soluzioni ordinarie riscaldate a 40-50° C. Bisogna badare soltanto a decolorare le sezioni nell'alcool e non negli acidi allungati, i quali tolgono il colore ai bacilli in discorso.

Si colorano del resto assai bene colla soluzione alcalina di metilene, preparata secondo la formula di Löffler, oppure, come consiglia il Gaffky (1), lasciando le sezioni per 20-24 ore in una soluzione concentrata di bleu di metilene, preparata fresca ogni volta mescolando a parti eguali la soluzione alcoolica satura coll'acqua distillata; si lavano quindi nell'acqua senza acido, si disidratano nell'alcool, si rischiarano coll'olio di trementina e si conservano finalmente nel balsamo del Canadà.

Gli autori affermano che col metodo di Gram i bacilli tifosi si decolorano; io ho però ripetutamente usato cotesto metodo per la colorazione dei bacilli in discorso, e li ho ottenuti colorati come gli altri, avendo soltanto l'avvertenza di lasciare le sezioni nel liquido colorante per 12-24 ore.

I bacilli del moccio si comportano egualmente e si decolorano in presenza degli acidi diluiti. Si colorano bene invece nella soluzione di Löffler. Lo Schütz (2), che li ha studiati per primo insieme col Löffler, consiglia il metodo seguente: si prendono le sezioni di nodo moccioso fresco, non indurito nell'alcool, e si tengono per 24 ore in un liquido colorante, formato dalla miscela a parti eguali di una soluzione alcoolica concentrata

---

(1) Gaffky, Mittheilungen a. d. kais. Ges., Bd. II, p. 378.
(2) Schütz, *Thierärztliche Mittheilungen*, 1883.

di bleu di metilene e di una soluzione di potassa a 1 : 10,000; si lavano nell'acqua acidulata con acido acetico (4 goccie in un vetrino da orologio pieno d'acqua), si tengono per 5 minuti nell'alcool diluito al 50 % e per 15 minuti nell'alcool assoluto; si rischiarano coll'olio di cedro e si conservano nel balsamo.

I bacilli del moccio nei pezzi induriti nell'alcool si colorano difficilmente e sono anche assai difficili da osservarsi. È necessario perciò di ricercarli coll'immersione omogenea e coll'apparecchio di Abbe. È più facile ritrovarli negli organi degli animali (cavie e cani giovani) nei quali si è praticato l'innesto del virus moccioso.

Il processo di colorazione suesposto non si può applicare alla diagnosi della malattia nel vivente, poichè unitamente ai bacilli specifici si colorano anche tutte le altre forme di microbi che si trovano nel muco nasale, e non si conosce ancora un metodo che serva per la colorazione isolata di quelli del moccio.

I PNEUMOCOCCI si colorano bene coi metodi ordinari ed anche col metodo di Gram. Per colorare le *capsule*, da cui in date circostanze si trovano avvolti, se si tratta di preparati a secco, basta colorarli nella soluzione acquosa semplice di genziana riscaldata, lavarli nell'acqua ed osservarli in questa al microscopio; oppure si disseccano e si conservano nel balsamo, senza però trattarli coll'alcool, che toglie la tinta alle capsule stesse.

Per avere la colorazione di queste nelle sezioni di tessuto polmonare, si usa il seguente processo del Friedländer (1) colla soluzione acida di genziana:

Soluzione alcoolica concentrata di genziana	50,0
Acqua distillata	100,0
Acido acetico	10,0

Si lasciano le sezioni in questo liquido per 24 ore, si decolorano per 1-2 minuti in una soluzione acquosa di acido acetico a 0,1 %, si disidratano rapidamente nell'alcool e si trattano coll'olio di garofani ecc., come di solito.

(1) FRIEDLAENDER, Fortschritte der Medicin, N. 3, p. 32, 1885.

GLI SPIROCHETI DELLA FEBBRE RICORRENTE si alterano facilissimamente in presenza dei reattivi, anche in presenza dell'acqua, e si colorano difficilmente. Nel sangue, disteso in istrato sottile sui coproggetti e disseccato, gli elementi in discorso si colorano sufficientemente colla fucsina e col violetto di metile o di genziana. Ma nelle sezioni non si rendono evidenti che per mezzo dei colori bruni di anilina, ed il Koch è riuscito appunto a colorarli nei tessuti, usando il bruno d'anilina sciolto nel miscuglio a parti eguali di glicerina e di acqua. Il Löffler però afferma che si colorano bene anche colla sua soluzione alcalina di bleu di metilene.

I FUNGHI DELLE MUFFE, che si trovano nelle vie aeree nelle bronco-pneumomicosi, si colorano facilmente nelle sezioni usando il metodo di Löffler col bleu di metilene in soluzione alcalina, oppure tenendo i preparati per 12 ore in una soluzione acquosa diluita di vesuvina.

L'ACTINOMICES il quale, come sembra, appartiene agli ifomiceti (conidiomiceti), si vede già nelle sezioni dei tessuti induriti, senza alcun trattamento, oppure dopo averle rischiarate colla potassa o cogli acidi allungati, i quali servono anche a decalcificare gli ammassi di funghi già vecchi, ove si depositano spesso i sali calcari. Volendo fare la ricerca dell' « actinomices » nel pus, non si deve aggiungere a questo nessun liquido, giacchè i conidi del fungo si alterano e scompaiono anche nell' acqua semplice. Per colorarli si usano i metodi seguenti:

A) *Metodo di* Weigert. Questi si è servito dell'orceina, disciolta nel modo proposto dal Wedl. Si prende l'estratto purificato del lichene (Roccella tinctoria), si priva del tutto dell'ammoniaca che contiene, tenendolo esposto all'aria qualche giorno: si prepara quindi la soluzione prendendo 20 ccm. di alcool assoluto, 5 ccm. di acido acetico e 40 gr. di acqua distillata, ed aggiungendovi a poco a poco l'estratto fino ad ottenere un liquido di un color rosso scuro, che dopo filtrato diventa rosso rubino. Si tengono le sezioni in questo liquido per

1 ora circa, si lavano rapidamente nell'alcool, si mettono in una soluzione acquosa di genziana all' 1 $^{0}/_{0}$ e si trattano quindi come nella colorazione ordinaria dei microrganismi. In tal guisa si vedono i nuclei colorati in bleu-violetto, il tessuto connettivo in arancio chiaro e la parte interna granulosa degli ammassi di fungo colorata in bleu chiaro e diffuso; questa è talora separata per mezzo di una zona incolora dai rigonfiamenti claviformi raggiati, i quali appaiono tinti d'un bel rosso rubino.

Questa colorazione non è però così facile e sicura nella riuscita come quella ordinaria: bisogna badare a che la soluzione di orceina sia recente, e a non lavare troppo a lungo i preparati coll'alcool, altrimenti questo porta via il colore rosso anche ai conidii.

Per iscoprire questo fungo nella carne di porco, il Duncker (1) ha usato il seguente processo. Si fa una soluzione satura di cocciniglia nell'alcool, e se ne pongono 10 goccie in un vetro da orologio pieno d'acqua. Si tengono le sezioni in questo liquido per 8 ore e quindi si lavano ripetutamente nell'alcool, si rischiarano coll'olio di bergamotto e si chiudono nel balsamo. Gli attinomiceti appaiono di un magnifico rosso sul resto del campo colorito in roseo. Per ottenere la colorazione doppia, si tengono immerse per 1-3 ore le sezioni colorate colla cocciniglia in una soluzione di ematossilina, e si trattano quindi come sopra.

Per la colorazione delle *amibe* libere e delle cellule senza membrana, si può usare, come consiglia il Brass (2), la soluzione seguente:

Cloruro di platino . .	1 parte
Acido cromico	1 »
Acido acetico	1 »
Acqua	400-1000 parti

---

(1) DUNCKER, Zeitschrift für Mikroskopie und Fleischbeschau, III, 1884, No. 3.

(2) BRASS, *Die Methoden bei der Untersuchung thierischer Zellen*, Zeitschrift für wissensch. Mikroskopie, Bd. I, p. 39, 1884.

Le sezioni di pezzi induriti in una soluzione di acido cromico a $^1/_8$ - $^1/_2$ $^0/_0$ si tengono nella miscela anzidetta per qualche minuto, si lavano nell'alcool al 30 $^0/_0$ e quindi nell'alcool sempre più concentrato, finchè si mettono nell'alcool assoluto.

Colorazione dei microfiti cutanei.

Come appendice ai metodi di colorazione speciali esporrò i processi messi in uso dal Bizzozero (1) per lo studio dei microrganismi della pelle normale, giacchè servono ugualmente per la ricerca dei parassiti cutanei appartenenti alla stessa classe.

Siccome la difficoltà principale per la colorazione dei prodotti epidermici si ha nella presenza del grasso, così conviene anzitutto eliminarlo, specialmente quando si tratta di esaminare la forfora. Quindi i peli o le squamette epidermiche si pongono anzitutto nell'alcool assoluto, vi si lasciano qualche ora, si mettono nell'etere solforico e dopo 1-2 giorni di nuovo nell'alcool assoluto, ove si conservano indefinitamente pronti sempre per essere esaminati. Il Bizzozero ha indicato tre metodi, che servono di complemento l'uno all'altro per la dimostrazione dei singoli microfiti.

Nel 1° si mette in opera l'azione dei reattivi dissolventi, acido acetico e potassa caustica. L'acido acetico si usa in soluzione concentrata (50 $^0/_0$), e la potassa in soluzione del 10 $^0/_0$. Si pongono le squamette, digrassate come sopra, in una goccia di queste soluzioni sul coproggetti, si disgregano delicatamente cogli aghi, se sono ammassate, e quando l'azione del reagente che si adopera le ha rigonfiate a sufficienza, si coprono con un vetrino e si osservano. Le cellule appaiono rigonfie e semi-trasparenti, mentre i microbi si vedono coi loro contorni scuri e ben definiti. Volendo conservare i preparati fatti coll'acido acetico, non si ha che porre sui bordi del vetrino una goccia di glicerina fenica, la quale va a sostituire l'acido e mantiene la preparazione.

---

(1) Bizzozero, *Sui microfiti della epidermide umana normale*. Estratto dal vol. pubblicato pel giubileo dottorale del Sen. Sperino. Torino 1884.

Gli altri due metodi si giovano dei reattivi coloranti ordinari e specialmente del *bleu di metilene*, col quale si ottiene una colorazione limitata quasi esclusivamente ai microfiti. Si può semplicemente porre le squamette od i peli in una goccia di glicerina leggermente tinta col bleu di metilene, rimuoverli coll'ago perchè vengano bene a contatto colla materia colorante, e dopo 10-15 minuti esaminarli come sopra. Oppure le squame digrassate si fanno rigonfiare nell'acido acetico al 50 °/₀ (per un ¹/₄ d'ora o poco più), si distendono sul portoggetti e si fa evaporare l'acido a moderato calore; si fissano quindi passando il preparato per 3 volte attraverso la fiamma, come nell'esame degli sputi tubercolari, e vi si depongono sopra alcune goccie della sostanza colorante. Naturalmente è da consigliarsi di fare contemporaneamente parecchi preparati e trattarli con diverse soluzioni coloranti, per un tempo variabile da pochi minuti a mezz'ora. Si lavano quindi con acqua, si fanno essiccare e si chiudono in balsamo o in damar.

Il bleu di metilene è il più adatto di tutti, anche per la colorazione dei microparassiti della pelle (Achorion Schönleini, Tricophyton), specialmente se si usa in soluzione fortemente alcalina (Löffler).

Per colorare il fungo del mughetto (*oidium lactis*), se ne fanno preparati sui coproggetti alla maniera ordinaria, si essiccano alla lampada, si lavano coll'alcool e coll'etere e si colorano colla soluzione acquosa di genziana all'1 °/₀.

Per colorare il *leptotrix buccalis*, se questo si trova già in un mezzo acido, basta trattarlo collo iodio per avere la colorazione violetta del suo contenuto: se invece la reazione è alcalina, si rende acida coll'acido cloridrico od acetico diluiti e si colora quindi collo iodio.

Valore ed importanza della colorazione.

Se l'applicazione dei colori d'anilina e dell'apparecchio d'illuminazione di Abbe alla tecnica dei microrganismi ha facilitato assai lo studio degli stessi, non per questo si può dire che sieno state rimosse tutte le difficoltà e le cause di errore inerenti ad un tal genere di ricerche. È necessaria una lunga esperienza per poter superare certe difficoltà e per riconoscere ed evitare alcune sorgenti d'errore, le quali sono state ormai poste in evidenza dagli osservatori, e che è necessario di insegnare a chi si accinge a questi studi.

Si possono distinguere tre specie di errori possibili: *a*) si possono scambiare con microrganismi altri elementi che non lo sono; *b*) si può giudicare della presenza di microparassiti là dove invece non si tratta che di mera accidentalità (germi provenienti dall'esterno o dovuti alla putrefazione); *c*) finalmente dal risultato negativo della colorazione si può talora erroneamente escludere la presenza dei microbi, là dove invece realmente ci sono.

Quanto alla prima causa d'errore, può lo scambio avvenire anzitutto coi *detritus granulari*, ossia con quelle granulazioni provenienti dalla distruzione del nucleo, nei casi di morte cellulare locale in mezzo a tessuti in cui continua ancora la circolazione (cosidetta *Coagulationsnecrose* da Cohnheim e da Weigert). Cotesti *detritus* si colorano intensamente colle tinte d'anilina e potrebbero essere scambiati con colonie di micrococci. Si differenziano però facilmente pel loro volume maggiore e per la forma irregolare, ed anche perchè non sono mai collegati in ammassi o in catene. Un altro criterio differenziale è pure il modo di aggruppamento degli stessi, il quale ricorda, almeno in principio, la figura del nucleo primitivo. Queste differenze sono importanti a ricordarsi, giacchè il processo di cariolisi è spesso legato alla presenza di microparassiti, e si incontra soventi nelle affezioni settiche e nelle infiammazioni caseose. Il Weigert ha pure osservato nei processi che de-

corrono con setticemia la presenza di certi granuli, specie di goccioline, che si distinguono pel loro splendore dai detritus granulari, dai nuclei e dai microbi, ma si colorano intensamente colle tinte d'anilina ed anche coll'ematossilina. Il Weigert li crede composti da leucina.

Più facile però può essere lo scambio colle granulazioni di certe cellule speciali, descritte dall'Ehrlich (1) col nome di *Mastzellen* o *Plasmazellen*, che io proporrei di chiamare nel nostro idioma semplicemente *cellule granulose* di Ehrlich, indicando con questo nome la caratteristica morfologica principale delle stesse, giacchè finora non se ne conosce il significato. Queste cellule (2), di forma diversa, rotonda, piatta od ovale, sono grandi il doppio circa delle cellule linfoidi, e sono formate da un nucleo circondato da ammassi di granulazioni protoplasmatiche. Si trovano in gran quantità nel tessuto connettivo, e sono specialmente numerose nelle mucose, nel tessuto sottomucoso, nel connettivo intramuscolare, nelle sierose ecc.; stanno per lo più vicino ai vasi, o aderenti alle pareti degli stessi e quasi sempre isolate. Aumentano poi notevolmente di numero nei processi patologici i più differenti; sono abbondanti nel tessuto di granulazione che si forma lentamente, abbondano nell'elefantiasi, all'intorno dei tumori e così via. Sono state anche trovate nel sangue leucemico, mancano però nell'uomo nel sangue normale. Il Koch le ha trovate numerose nel sangue e specialmente nella milza e nei polmoni dei topi bianchi.

Le granulazioni di queste cellule si comportano verso i colori di anilina al rovescio di tutte le altre, giacchè mentre in queste si colorano soltanto i nuclei, nelle cellule granulose invece si colora solamente il protoplasma coi suoi granuli, ed il nucleo rimane incoloro. E siccome le granulazioni hanno la stessa gran-

---

(1) Ehrlich, Archiv für mikroskopische Anatomie, Bd. XIII, 1877, p. 263.

(2) Westphall, *Ueber Mastzellen*, Inaug.-Dissert., Berlin 1880. — Schwarze, *Ueber eosinophile Zellen*, Inaug.-Dissert., Ibid. 1880. — Spilling, *Ueber Blutuntersuchungen bei Leukämie*, Inaug.-Dissert., ibid. 1880.

dezza di certi micrococci, se il nucleo è scomparso o è poco visibile, le cellule in discorso possono avere l'aspetto d'una colonia di microrganismi; se poi la cellula si è disgregata, come accade facilmente nel distendere i liquidi sui coproggetti, le granulazioni possono apparire come cocci isolati o riuniti in gruppi.

I criteri che servono ad evitare l'errore sono la grandezza disuguale, il tono di colore speciale (rossiccio, se la colorazione si è fatta colla tinta violetta), ed il confronto con altre cellule consimili rimaste intatte, nelle quali sia possibile distinguere il nucleo, facendo anche, se occorre, preparati cogli stessi liquidi o tessuti tolti da un animale sano della stessa specie. Per evitare poi qualsiasi scambio degli elementi organici coi microbi, si usa ora il metodo di Gram o quello primitivo del Koch (1), che consiste nel trattare le sezioni colorate colle tinte d'anilina, invece che coll'acido acetico o coll'alcool, con una soluzione diluita di carbonato di potassa che toglie il colore a tutti gli elementi organici, eccetto che ai microrganismi.

La seconda classe d'errori comprende il caso in cui nel corso delle manipolazioni istologiche, oppure in causa della putrefazione, si aggiungono ai tessuti microrganismi che non hanno alcun significato, riguardo alle alterazioni patologiche delle quali si ricerca l'origine, e che potrebbero essere giudicati erroneamente come elementi parassitari. Così, ad esempio, si possono incontrare forme isolate di microrganismi che provengono dalle soluzioni coloranti, o dall'acqua distillata con cui si lavano i preparati, giacchè questa, come è noto, ne contiene sempre in certa quantità. Basta però averne veduto una volta per imparare subito a riconoscere questa sorgente d'errore, che si può del resto anche evitare sterilizzando l'acqua che si adopera per le manipolazioni istologiche. Taluni però, come osserva il Friedländer, hanno l'abitudine di lasciare le sezioni magari per un giorno e più nell'acqua distillata e creduta priva di germi, ed

(1) Koch, *Wundinfectionskrankh.*, p. 38.

allora si possono raccogliere sulla superficie e sui margini delle sezioni stesse un'infinità di microrganismi, i quali poi colorati possono far cadere gli inesperti in errori grossolani.

Avvi infine il processo naturale di putrefazione il quale, specialmente nei casi di malattie infettive, è assai rapido e precoce ed è accompagnato dalla presenza di numerosi microbi. Si deve sempre sospettare che si tratti di ciò, quando si incontrano forme di microrganismi isolati alla periferia degli organi.

Fortunatamente però questi esseri microscopici, che accompagnano e producono la putrefazione (in generale in principio non sono che grossi bacilli), si riconoscono con facilità, ed è difficile scambiarli coi microparassiti. Tuttavia è sempre bene esprimersi con riserva a riguardo dei risultati dell'osservazione di tessuti, in cui è già avviato il processo di decomposizione; e quando si tratta di ricerche negli animali, si deve sempre estrarre i visceri appena dopo la morte, od anche uccidere l'animale quando è prossimo a morire, e porre immediatamente gli organi da esaminare nell'alcool assoluto.

In terzo luogo ho detto che, quand'anche colla colorazione non si riesca a mettere in evidenza nessuna specie di microparassiti, non sempre si è autorizzati ad escluderne la presenza nei tessuti presi in esame, potendovene essere alcuni i quali sono indifferenti verso i metodi di colorazione usati fino ad oggi. Pur troppo non tutti cotesti elementi parassitari si colorano egualmente, e non si conosce ancora un metodo veramente generale di ricerca microscopica, che serva indubbiamente per tutte le specie, giacchè l'azione che esercitano le varie sostanze coloranti su questi esseri è tutt'altro che costante ed uniforme, ed ognuno ha per un dato colore un'affinità speciale.

Così i micrococci della gonorrea e quelli dell'endocardite maligna si colorano meglio col bleu di metilene che colle altre sostanze; i bacilli della lebbra non si colorano affatto col bruno di Bismarck, si colorano debolmente col bleu di metilene e benissimo invece colla fuscina; lo *spirochete* di Obermeier nelle sezioni degli organi non si colora se non colla vesuvina (Koch), e così via.

Bisogna però in ogni caso andare cauti nel giudicare di queste cosidette *affinità speciali* o *specifiche*, giacchè vi sono certe condizioni che fanno variare moltissimo il modo di comportarsi dei microrganismi di fronte alle varie sostanze coloranti. Ho già detto che il calore diminuisce questa affinità, e se supera un certo grado, anche l'annulla; ma talora basta anche il semplice disseccamento a produrre lo stesso effetto. In certi casi poi riesce persino quasi impossibile rintracciare la cagione per cui i microbi perdono la loro facoltà di colorarsi: così il Koch ha trovato che nella milza di animali, morti per infezione carbonchiosa, degli stessi bacilli taluni si colorano ed altri no; così parimenti non è raro il caso di osservare nell'interno degli organi, accanto ad ammassi di micrococci intensamente colorati, alcuni gruppi d'un colore più sbiadito ed altri poi assolutamente incolori. Probabilmente questo fatto è analogo a quello che si osserva nei nuclei delle cellule colpite da necrosi locale in mezzo ai tessuti viventi, i quali nuclei non si colorano più; è forse, cioè, il fatto della morte che toglie anche ai microrganismi la proprietà di combinarsi colle materie coloranti.

Finalmente è da menzionarsi ancora un piccolo difetto, che ha talora il metodo della colorazione per queste ricerche. Quando gli elementi parassitari si trovano riuniti in masse molto dense e compatte (zooglee), la colorazione, specialmente se è intensa, li rende meno trasparenti e li fa apparire quali masse uniformi; mentre che, trattando i tessuti coi reattivi dissolventi, si distinguono bene i singoli individui da cui sono costituiti quei gruppi.

Ad ogni modo però resta fermo il fatto che noi abbiamo nella colorazione, specialmente se è unita coll'uso dell'apparecchio illuminante di Abbe, un mezzo potentissimo di aiuto, che ci permette di riconoscere anche la presenza di forme isolate di microbi in mezzo ai varii elementi dei tessuti.

CAPITOLO IV

Ricerca dei microparassiti nell'organismo animale (liquidi e tessuti).

L'importanza che ha acquistato in questi ultimi tempi lo studio dell'eziologia delle malattie d'infezione è invero grandissima, e gli studi dei patologi debbono ormai su questo terreno essere rivolti a rintracciare con cura la presenza di microbi eziandio in quelle malattie endemiche ed epidemiche, delle quali non si è ancora dimostrato con sicurezza il nesso causale con forme speciali di microrganismi patogeni. Ma questo còmpito per quanto è importante altrettanto è difficile da eseguirsi; e noi, nello additare la via migliore da tenere per tali ricerche, seguiremo le norme date dal Koch, e divideremo la questione in *tre problemi principali*, la cui soluzione completa è indispensabile per acquistare la certezza della natura parassitaria di una malattia infettiva.

1° Anzitutto dev'essere dimostrata negli organi ammalati una data specie di microrganismi, sufficientemente caratterizzati per proprietà morfologiche, in tutti i casi di quella tale malattia; questi inoltre devono trovarsi nel corpo ammalato in tale quantità e distribuiti in modo, che servano a spiegare la origine dei fenomeni morbosi.

2° Sabiliti questi fatti, viene in seconda linea il còmpito di coltivare *isolat*[illegible] di fuori dell'organismo, i micro

specifici nei mezzi di nutrizione più adatti pel loro sviluppo, i quali, secondo i dettami del Koch, debbono essere *solidi* e *trasparenti*. Su questi si devono studiare le proprietà morfologiche e biologiche caratteristiche del parassita, facendolo riprodurre nei mezzi di nutrizione attraverso parecchie generazioni e cercando quindi di scoprire il modo con cui penetra nell'organismo animale, seguendolo nei suoi rapporti coll'aria, coll'acqua e col terreno.

3° Finalmente, allorchè trasportando piccolissime porzioni di quelle colonie da uno ad un altro nuovo terreno nutritizio successivamente, si è acquistata la certezza che l'ultima generazione non contiene più nessuna traccia di sostanze organiche, provenienti dal corpo animale primitivamente ammalato, si deve innestare il prodotto puro dell'ultima coltivazione negli animali, nello intento di riprodurre in questi la stessa forma di malattia che ha fornito il materiale per la prima cultura.

Per quel che riguarda la prima e la seconda di queste condizioni, indispensabili tutte per l'esatta dimostrazione della natura parassitaria del male, non è sempre facile di poterle stabilire in modo chiaro e positivo, giacchè non di rado negli organi, specialmente in quelli che sono in rapporto col mondo esterno (cute, apparecchio respiratorio, digerente e genito-urinario), si trovano parecchie specie di microbi. In tal caso è necessario ottenere anzitutto isolata ciascuna specie degli stessi, e provare successivamente negli animali quale è che ha importanza pel suo potere patogenico. In questa parte appunto dello studio dell'eziologia delle malattie infettive si è dimostrato il vantaggio grandissimo che ha sugli altri il metodo di coltivazione del Koch, che usa i materiali solidi e trasparenti, giacchè coi metodi primitivi non si potevano avere guarentigie sufficienti per l'esattezza dei risultati delle ricerche.

Questa esattezza è tanto più necessaria, inquantochè non sempre è possibile di condurre a termine la terza parte del nostro còmpito; anzi può dirsi che per la specie umana manca quasi completamente quest'ultimo anello delle ricerche micropa-

rassitologiche. Il riprodursi della malattia infettiva, per mezzo dell'innesto fatto col materiale puro della cultura del microbo specifico, nell'uomo si è fatto finora soltanto per la risipola e per la gonorrea; ma per le altre malattie più pericolose, quali sono la sepsi, il colèra, ecc., non è lecito il farlo.

A questo difetto si può fino ad un certo punto supplire coll'esperimento sugli animali più affini, quando questi sieno suscettibili di contrarre la stessa forma morbosa che si sviluppa nell'uomo; ma quando neanche ciò è possibile, si è costretti a ricorrere ai due primi criterii i quali, se sono stati stabiliti in maniera completa e positiva, permettono sempre di trarre per analogia conclusioni attendibili. Difatti, parlando delle proprietà biologiche di questi esseri, ho già citato esempi negli animali di malattie eminentemente infettive, presa la parola nel suo significato moderno di malattie causate dalla presenza di microparassiti, le quali tuttavia non sono trasmissibili neppure a specie strettamente affini. Basti citare per tutte l'esempio della « setticemia bacillare » dei topi bianchi, per la quale non sono suscettibili neanche i topi campagnuoli.

Il Koch ha dimostrato che certe malattie da infezione attecchiscono soltanto negli individui giovani e non negli adulti della stessa specie. Nessuna meraviglia adunque che anche per l'uomo esistano casi analoghi di malattie infettive a lui speciali e non trasmissibili agli altri animali; e se in tal caso manca la prova assoluta e diretta per la dimostrazione della natura parassitaria del male, vi sono tuttavia altri criteri indiretti, è vero, ma altrettanto sicuri per raggiungere l'istesso scopo.

Il trovare in ogni caso della malattia in questione costantemente la stessa forma di microrganismi, e il non trovarla invece in altre malattie e neppure negli individui normali, il vederla diffusa nei vari organi ammalati in maniera sufficiente per ispiegarne la patogenesi, e finalmente le caratteristiche speciali biologiche che la distinguono dalle specie affini sono tali criteri, che hanno oggimai un grandissimo valore per le conclusioni che se ne possono trarre a riguardo dell'eziologia della ma-

lattia che si studia, essendo possibile coi mezzi odierni di ricerca di escludere errori grossolani di scambio con altri microbi che non sieno gli specifici.

Corrispondentemente a quest' ordine di ricerca, stabilito dal Koch, noi divideremo pure la materia da svolgere cominciando dall'esporre il modo di rintracciare i microparassiti nell'organismo animale, nell'aria, nell' acqua e nel terreno, per passare quindi ai mezzi di nutrizione ed alle culture isolate e terminare finalmente colla trasmissibilità degli stessi agli altri animali.

Ricerca dei microrganismi nei liquidi.

È necessaria per queste ricerche la osservanza più scrupolosa delle cautele di disinfezione e di sterilizzazione di tutti gli oggetti che si adoperano, per evitare più che si può il mescolarsi di germi estranei coi liquidi da esaminare. Quindi nettezza assoluta dei recipienti ove si raccolgono, degli stromenti coi quali si maneggiano e dei vetri sui quali si osservano al microscopio; tutti gli oggetti che sono di vetro saranno in precedenza accuratamente nettati coll' alcool, e se occorre, anche sterilizzati col calore, e conservati in recipienti chiusi lungi dal contatto diretto dell'aria atmosferica. I liquidi devono inoltre essere esaminati allo *stato fresco*, ossia appena estratti dal vivente o dal cadavere, giacchè anche dopo poche ore si può trovare il numero dei microrganismi grandemente moltiplicato. Non è da consigliarsi adunque di conservare i liquidi, ma di esaminarli subito al microscopio, sia direttamente, sia coll'aiuto dei reattivi coloranti.

Per prendere il liquido che si vuole osservare, se si tratta di sangue del vivente, si comincia dal lavare accuratamente la cute coll'acqua e sapone e quindi con una soluzione di acido fenico al 5 $^{0}/_{0}$, o di sublimato all'1 $^{0}/_{0}$; si lava dipoi coll' alcool per portar via il sublimato (avvertenza indispensabile quando si vo-

glia col sangue fare coltivazioni) e coll' etere per togliere l'alcool, e dopo che questo si è evaporato, si fa un' incisione con una lancetta previamente arroventata; oppure si pone allo scoperto e si apre una piccola vena, e si raccoglie immediatamente il sangue su di un vetrino coproggetti, distendendovelo sopra coll'ago di platino sterilizzato. Si può anche coprire la cute con un sottile strato di collodion, lasciarlo essiccare e far la puntura attraverso questo strato, per far sì che il sangue si espanda su questo e non venga a contatto colla pelle, ove potrebbe inquinarsi con germi estranei.

Si può anche, come consigliano alcuni, porre sul luogo ove si vuol fare il taglio una goccia di soluzione di cloruro sodico indifferente (0,8 %) sterilizzata, incidere la cute attraverso alla goccia con un bistori disinfettato e con un altro coltello aprire il vaso sanguigno: il sangue misto alla soluzione di cloruro sodico si distende sul vetrino, come sopra. Finalmente si usa anche raccogliere il liquido sanguigno introducendo in una vena, posta allo scoperto colle norme antisettiche, un tubo di vetro capillare sterilizzato (Salomonsen).

Le regole esposte per raccogliere il sangue si applicano egualmente per qualunque altro liquido dell'organismo animale vivente (contenuto di flittene, pus, ecc.). In ogni caso è da raccomandarsi di raccogliere il liquido e distenderlo sui coproggetti col mezzo dell'ago di platino, giacchè questo si può facilmente ad ogni volta sterilizzare sulla fiamma in modo sicuro.

L'esame dei liquidi, diretto allo scopo speciale della ricerca dei microrganismi, può essere fatto in due maniere: *a*) Esame diretto; *b*) Esame coi reattivi.

A) Esame diretto.

L'esame diretto del materiale vivente è quello che deve farsi prima di ogni altro e non deve mai essere trascurato, avendo un grande interesse per stabilire alcune proprietà morfologiche ca-

ratteristiche dei singoli microrganismi. Soltanto per chi comincia, siccome si tratta di una ricerca delicata e difficile, è da consigliarsi di far questo genere di esame dopo aver preso esatta cognizione dello stesso materiale coll' aiuto dei reagenti coloranti.

La tecnica è semplicissima; si prende una goccia del liquido coll'ago di platino sterilizzato sulla fiamma, oppure con una pipetta egualmente sterilizzata, e si pone su di un vetro portoggetti; si copre con un vetrino e si chiude ai margini con cera o con paraffina liquefatta. I vetrini porta- e coproggetti devono essere lavati prima coll' alcool, fatti asciugare e sterilizzati col calore e finalmente adoperati dopo che sono di nuovo divenuti freddi, perchè il calore non uccida i microbi. In questo caso però le cautele antisettiche rigorose sono quasi superflue, perchè si tratta di un' osservazione di breve durata e non già di fare una cultura. Per facilitare l' osservazione si usa generalmente diluire il liquido che contiene microbi con acqua, oppure con una soluzione di sal di cucina o di peptone sterilizzata, per evitare che quelli, essendo numerosi ed ammassati, offrano un' imagine confusa.

Se però il liquido non contiene un gran numero di microrganismi, e se si vuole avere la certezza assoluta che quelli che vi si trovano appartengono in realtà al liquido stesso, si deve anzitutto farne l'esame senza aggiunta di sorta.

Una delle proprietà principali che si rileva con questo genere di esame è la *mobilità* dei microrganismi, i quali si vedono per lo più in preda a vivaci movimenti. Bisogna però andar cauti nel giudicare di questa proprietà, per evitare l'errore di uno scambio dei movimenti propri di quelli col semplice movimento danzante, cosidetto *browniano*, che hanno tutti i piccoli corpicciuoli quando si trovano sospesi nei liquidi. È necessario, per poter giudicare giustamente della mobilità dei microrganismi, di aver prima esercitato l'occhio alla osservazione del semplice movimento molecolare danzante. A tale scopo si mescola in una goccia d' acqua una piccola quantità di carmino finamente polverizzato e si esamina al microscopio; si vedono così i granuli della sostanza colorante in preda a movimenti vivacissimi, che sembrano spontanei e sono invece movimenti passivi, ma così energici da non averne idea se prima non si sono visti. Con tutto ciò la sicurezza che in un dato caso si tratti veramente di movimenti propri non si può avere se non colla prova di controllo, che consiste nel vedere se il movimento

cessa, producendo ad arte condizioni incompatibili colla vita di quegli esseri, quale sarebbe il trattamento cogli acidi e così via.

L'esame diretto dei liquidi basta già in molti casi a dimostrare la presenza di organismi microscopici, ed è infatti questo semplice processo che ha servito pei lavori classici del Pasteur e del Tyndall. Però da solo non è sufficiente, perchè molti microrganismi nei liquidi sfuggono all'osservazione, non tanto per la loro sottigliezza, quanto specialmente in causa della loro mobilità, della mancanza d'ogni colorazione e del debolissimo potere di refrazione che posseggono. Tuttavia l'osservazione microscopica diretta, che dev'essere fatta con diaframmi stretti, serve per istudiare non solo il movimento dei microbi, ma anche altre proprietà loro interessanti, quali sono la formazione di spore e la germinazione; il che si fa, come ho detto, per mezzo delle *camere umide*.

B) Esame dei reattivi.

Il principio dell'azione di queste sostanze è quello di tutte le altre congeneri usate in istologia; di mettere, cioè, in evidenza i microrganismi a preferenza di tutti gli altri elementi coi quali si trovano per avventura commisti. La via che conduce al conseguimento di questo scopo può essere duplice: 1° Si può mettere a profitto la proprietà che hanno questi esseri di resistere all'azione di certe sostanze meglio che gli elementi organici dei tessuti, i quali si rendono con tal mezzo invisibili. 2° Si può invece, con migliore risultato, valersi dell'azione delle sostanze coloranti.

Il prime metodo è stato per la prima volta usato dal Recklinghausen e dal Klebs, e le sostanze che vi si adoperano, cosidette *reattivi dissolventi* o *rischiaranti*, sono principalmente gli *acidi* e gli *alcali* e in qualche caso anche l'*etere* e il *cloroformio*. In generale si usa l'acido acetico in soluzione concentrata (50 %), oppure una soluzione tenue di soda o di potassa (½-1 %), aggiungendone una goccia al preparato fissato sul coproggetti ed osservando quindi al microscopio. I microrganismi resistono per la maggior parte all'azione del liquido aggiunto e mostrano, illuminando il preparato con diaframmi stretti, contorni netti e decisi, mentre gli elementi dei tessuti divengono trasparenti fin quasi a scomparire.

Se però si tratta di microbi riuniti sotto forma di zooglea, questo processo serve abbastanza; anzi è l'unico caso in cui può riuscire utile anche a preferenza dell'uso delle materie coloranti, che fanno apparire le zooglee sotto l'aspetto di masse omogenee; ma all'infuori di questo caso il metodo suesposto è insufficiente, e lo è per molti motivi. Anzitutto perchè le conoscenze attuali che si hanno sul grado di resistenza dei vari microbi all'azione delle sostanze dissolventi sono ancora assai limitate, mentre invece sappiamo diggià che vi sono alcune specie di microparassiti, sottili e delicati i quali, anzichè resistere all'azione degli acidi e degli alcali, non resistono neanche a quella della semplice acqua. Tale è il caso, ad es., dello « Spirochaete Obermeieri », il quale si altera persino nell'acqua distillata: lo stesso accade, secondo Israel (1), anche pei giovani nodi di « Actinomyces », i quali debbono perciò essere ricercati senza aggiunta di nessun liquido estraneo. Ma vi sono anche altre sorgenti d'errore, ad es., nei granuli di materie inorganiche che possono essere scambiati con micrococchi, nonchè nei piccoli cristalli aghiformi che possono avere l'apparenza di bastoncini. Lo stesso dicasi per le minutissime goccie di grasso le quali, se posseggono un involucro albuminoso, resistono anche all'azione dell'etere e del cloroformio. Se ne conclude perciò che il metodo basato su queste semplici reazioni microchimiche può essere d'aiuto nella ricerca dei microparassiti nei liquidi, ma non è di per sè solo sufficiente.

Anche nella tecnica di queste ricerche siamo debitori al Koch di un progresso notevolissimo, che egli ha conseguito combinando il metodo di *fissamento* col calore, usato la prima volta dallo Ehrenberg (2) per conservare i microrganismi, con quello della colorazione, costituendone così un altro nuovo che è oggi universalmente conosciuto sotto il nome di *metodo del Koch* (3), il quale permette non soltanto di eliminare le difficoltà che rimanevano ancora coi processi primitivi, ma anche di poter conservare i preparati.

Il principio generale di questo metodo è, secondo le parole stesse del Koch, « di essiccare il liquido contenente microbi in istrato sottile sui vetrini coproggetti, per fissarveli, di trattarli

---

(1) Israel, Berl. Klin. Wochenschr. No. 23, 1884.
(2) Ehrenberg, opera citata.
(3) Koch, Cohn's Beiträge etc., t. II, p. 393.
Id. in Untersuch. über d. Aetiologie d. Wundinfectionskrankh. Leipzig 1878.
Id. in Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. I.

colle sostanze coloranti e rammollirli di nuovo, per renderli visibili e riportarli alla forma loro primitiva, di chiudere il preparato in liquidi conservatori e finalmente di fotografarli per ottenerne imagini da controllo fedeli alla verità ». I particolari adunque del metodo stesso sono di tre specie:

a) *Fissamento* del materiale contenente i microrganismi. I preparati non fissati si colorano male; ma d'altronde molti microrganismi, se vengono sottoposti per molto tempo all'azione dell'alcool o di altri mezzi che servono a fissarli, come pure se rimangono disseccati lungamente, perdono la loro affinità per le materie coloranti. Bisogna adunque per regola generale non lasciare agire troppo a lungo i mezzi di fissamento, giacchè i più bei preparati si ottengono dai liquidi (come dai tessuti) i quali sono stati fissati in breve tempo.

Il primo e il più semplice mezzo di fissare i liquidi è l'*essiccamento*. Dopochè coll'esame precedente del liquido ci siamo orientati sul contenuto di questo in microrganismi e sulla forma e mobilità degli stessi, si prende coll'ago di platino una gocciolina del liquido e se ne prepara anzitutto uno strato sottile su di un coproggetti, sia distendendovelo per mezzo dello stesso ago di platino, sia schiacciando la gocciolina con un altro vetrino sovrapposto e sfregandoli l'un contro l'altro colle dita. Lo strato di liquido così disteso, lasciato all'aria e coperto per evitare che vi cada il pulviscolo atmosferico, si dissecca rapidamente.

Se si tratta di esaminare il succo dei tessuti, si taglia l'organo, appena estratto, con un coltello precedentemente arroventato, si fa un secondo taglio perpendicolare al primo con un altro coltello sterilizzato egualmente e sull'ultima superficie posta allo scoperto si poggia il vetrino. Il succo che vi rimane adeso si schiaccia con un altro vetrino e si lascia essiccare, come sopra. Negli organi molto ricchi di sangue o costituiti da un parenchima molle il succo del tessuto è formato da una poltiglia così densa, che si lascia distendere difficilmente; ed in mezzo a questa riuscirebbe difficile rintracciare i microrganismi. In tali casi non si ha che depositare una goccia d'acqua sterilizzata sulla seconda superficie di taglio dell'organo, prima di posarvi il vetrino, e si procede quindi come si è detto.

Il disseccamento non altera affatto la forma dei microparassiti, come hanno dimostrato numerose osservazioni di controllo fatte con materiale

disseccato, posto a confronto con lo stesso allo stato naturale. Soltanto se vi sono zooglee di forma sferica, queste diventeranno appiattite, ed i microbi foggiati a spirale appariranno quali linee ondulate. Basta però inumidire il preparato per vedere ripristinarsi anche in questi casi la forma naturale.

Il disseccamento però non è un mezzo fissativo sufficiente. Se si tratta di liquidi poco o nulla albuminosi, può bastare di farli soltanto essiccare per quindi colorarli; ma se invece il liquido contiene albumina in quantità, questa col semplice disseccamento non diventa insolubile, e quindi in contatto colle soluzioni acquose coloranti lo strato si rammollisce e spesso anche si distacca dal vetrino, sul quale si depositano precipitati granulosi delle materie coloranti stesse, rendendo ogni cosa confusa. Il Koch afferma che, per evitare cotesto inconveniente, basta semplicemente usare, invece delle ordinarie soluzioni acquose, una soluzione concentrata di bruno d'anilina (cosidetto *neubraun*) in un miscuglio di glicerina e di acqua a parti eguali. Ad ogni modo però è preferibile rendere insolubile l'albumina che si contiene nello strato liquido essiccato, e questo si può ottenere sia per mezzo del *calore*, sia per mezzo dei *reagenti chimici* che coagulano l'albumina.

È stato l'Ehrlich (1) ed i suoi scolari quelli che hanno dapprima applicato il calore alla coagulazione dei liquidi albuminosi (sangue, pus, ecc.), distesi in lamine sui coproggetti. Egli però, per le sue ricerche speciali, assoggettava i preparati per una o più ore ad una temperatura di 120-130° C.; ed il Koch ha in seguito dimostrato che l'azione del calore, così forte e prolungata, impedisce poi la colorazione dei microrganismi, e basta invece tenere i preparati per 2-10 minuti al più alla temperatura anzidetta, per rendere insolubile l'albumina senza distruggere l'affinità dei microbi pei colori d'anilina.

Più comodo ed anche più spiccio è adunque il metodo proposto pure dal Koch ed ora usato generalmente per fissare i

(1) Ehrlich, Zeitschrift f. klin. Medicin, Bd. I. Heft 3.

preparati dei liquidi albuminosi. Consiste nel prendere con una pinzetta il vetrino, collo strato di liquido essiccato rivolto all'insù, e nel farlo passare per *tre volte* consecutive, con velocità moderata, attraverso la fiamma d'una lampada ad alcool o d'un becco di gaz che brucia senza fumo. Con un po' di pratica si impara presto il grado di velocità col quale è necessario far passare il vetrino attraverso la fiamma, perchè si riscaldi abbastanza a che l'albumina coaguli, ma non troppo da alterare la forma degli elementi.

Con tutto questo però succede sempre una leggiera alterazione della forma dei microrganismi; il Koch (1) ha, per es., osservato che i bacilli carbonchiosi, fissati col calore nel modo anzidetto, appaiono un po' più sottili e più delicati e la segmentazione loro caratteristica è meno evidente, di quello che se invece furono semplicemente essiccati e colorati quindi col bruno d'anilina, sciolto nel miscuglio di glicerina e di acqua. Questa circostanza è da tenersi a memoria, per usare sempre l'*identico* processo di preparazione quando si vogliono istituire confronti fra diversi preparati, tanto più che molte specie di microbi si rassomigliano assai nella forma gli uni cogli altri.

A questo proposito giova ricordare eziandio che gli stessi microrganismi possono apparire di diversa dimensione, specialmente nel loro diametro, anche quando vengono trattati semplicemente con sostanze coloranti diverse. Valga perciò l'esempio già ricordato del bacillo carbonchioso il quale, colorato col bruno d'anilina, non solo appare più grosso, ma mostra eziandio la segmentazione caratteristica de' suoi filamenti assai più chiara che con qualsiasi altra sostanza colorante. Sono piccoli particolari cotesti, ed hanno tuttavia un'importanza notevole per evitare errori di diagnosi grossolani nella ricerca dei microparassiti.

Il metodo di fissamento per mezzo del calore ha il grande vantaggio che si possono collo stesso preparare un gran numero di vetrini coi succhi dei vari organi e tessuti, tolti da un cadavere necroscopizzato, ad es., in località lungi dai laboratori, e si possono quindi conservare per la successiva colorazione ed esame.

La coagulazione dell'albumina nei liquidi lasciati essiccare sui vetrini in lamina sottile si può ottenere eziandio col mezzo dei reagenti chimici, *alcool, acido cromico e suoi sali, acido osmico, allume e tannino*. Il Koch, per l'esame del sangue fatto allo scopo di cui è qui parola, ha proposto di tenere immersi i coprog-

(1) Koch, Mitth. ecc. Bd. I, p. 5.

getti collo straterello di sangue nell'alcool assoluto per qualche giorno, finchè cioè l'albumina è diventata insolubile. Questo metodo ha il vantaggio di coagulare l'albume a grado a grado, di non alterare per nulla la colorabilità dei microbi e di impedire la formazione dei precipitati granulosi che disturbano l'osservazione. Ha però l'inconveniente che non si può determinare in precedenza il tempo che i preparati devono essere tenuti nell'alcool; talora basta un giorno e talora invece sono necessarie più settimane perchè lo strato albuminoso divenga insolubile. Cosicchè, volendo usare questo mezzo di fissamento, si debbono preparare un gran numero di vetrini, metterli nell'alcool e quindi di giorno in giorno estrarne qualcuno, per provare se sono divenuti adatti pel trattamento successivo coi colori d'anilina.

È naturale che, quando nelle ricerche di una malattia infettiva è necessario di orientarsi subito sulla presenza o meno di microparassiti nell'organismo, come sarebbe, ad es., il caso in cui si vuol conoscere il risultato di un innesto prima di farne un altro in un secondo animale, non si aspetterà senza dubbio il coagulamento operato dall'alcool, ma si userà invece il mezzo più spiccio del riscaldamento.

Un mezzo più rapido per ottenere la coagulazione dell'albumina, egualmente coll'alcool, è quello di assoggettare il preparato all'azione dei *vapori* di alcool assoluto. Si prende un vetrino da orologio che sia profondo, vi si versano dentro due goccie di alcool assoluto e sopra si pone il vetrino, colla superficie a cui aderisce lo straterello di materiale essiccato rivolta verso il liquido, senza però che ne sia toccata. Si copre con un altro vetro da orologio e si riscalda a calore moderato. Si può anche usare per lo stesso scopo la soluzione di acido cromico al 0,5 °/₀, oppure i vapori di acido osmico nella maniera esposta per quelli dell'alcool.

Questi reagenti chimici hanno il vantaggio di rispettare gli involucri gelatinosi e le ciglia dei microbi, cosa che non fa il calore; ma hanno d'altronde l'inconveniente che l'albumina si coarta spesso con troppa rapidità, in modo da alterare l'aspetto morfologico dei microrganismi, i quali

inoltre non sono più in grado di riacquistare la forma primitiva, essendo difficile di rammollire lo strato così coagulato. Si può però impiegare, dopo l'azione dei reagenti suddetti, un liquido che renda all'albumina coagulata una certa plasticità, senza farla distaccare dal vetro, e permetta all'elemento parassitario di riprendere le sue caratteristiche morfologiche naturali.

Il Koch usa a tale oggetto una soluzione di acetato di potassa (1 : 2 di acqua dist.), la quale serve bene e rende soltanto i microbi un po' più pallidi e un po' più trasparenti; lo che poi non è un grande inconveniente, specialmente per quelli che sono grandi e contengono spore. Questo liquido ha inoltre il vantaggio di conservare inalterata la forma degli elementi parassitari anche per mesi; cosicchè si possono osservare e conservare in pari tempo nella soluzione anzidetta, avvertendo semplicemente di chiuderli con uno strato di paraffina posto ai margini del coproggetti.

b) *Colorazione.* — Si è gia parlato dei vantaggi che offrono le sostanze coloranti di anilina su tutte le altre, e si è visto anche quali delle stesse sono più adatte per la colorazione dei microrganismi. Anche le particolarità del metodo del Koch sono state esposte relativamente appunto ai metodi di colorazione generali. Per la ricerca speciale dei microbi nei liquidi animali havvi soltanto da aggiungere ancora qualche piccolo dettaglio.

Pei preparati fissati sui coproggetti per mezzo del *calore* l'Ehrlich ed il Koch consigliano il *bleu di metilene* a preferenza di tutte le altre sostanze. L'Ehrlich consiglia di adoperarlo in soluzione acquosa concentrata, lasciandola agire per $^1/_2$ ora ed anche di più. Il Koch nel suo laboratorio usa la stessa soluzione leggermente alcalinizzata colla potassa. Il vantaggio di questa sostanza colorante sarebbe specialmente quello di non dare mai una colorazione eccessiva; ma a tal riguardo si deve notare che anche gli altri colori di anilina, violetto di genziana o di metile ecc., dànno gli stessi risultati, purchè se ne sappia misurare il grado di concentrazione e la durata dell'azione stessa. Del resto non bisogna mai trascurare, allorquando si tratta di casi difficili o dubbi, l'uso contemporaneo di parecchie materie coloranti, essendo assai diversa nei microrganismi l'affinità per i singoli colori d'anilina.

Quando è possibile, bisogna sempre trattare contemporaneamente alcuni preparati anche coi colori bruni di anilina, coi quali soltanto si può fare la riproduzione fotografica degli stessi.

Si adopera perciò la soluzione glicerica di bruno d'anilina, preparata nel modo già descritto; se ne versano alcune goccie sul preparato, vi si lascia per qualche minuto e si sostituisce con una goccia di glicerina (la soluzione di acetato di potassa ed il balsamo non sono adatti perchè decolorano), ove si osservano e si conservano per poi fotografarli.

Se i preparati sono ben fatti, che è quanto dire se sono stati convenientemente fissati col calore o coll'alcool e colorati poi con soluzioni ben preparate, non devono mostrare alcun precipitato granuloso nè deposito di sostanza colorante; e se la colorazione fu condotta al giusto grado, devono apparire colorati intensamente i nuclei ed i microrganismi, ed il fondo del preparato dev'essere colorito invece debolmente. Quanto agli elementi, naturali o prodotti durante le manipolazioni, che si possono scambiare coi microrganismi, se ne è già parlato in generale nel capitolo precedente. Nel caso presente potrebbero negli inesperti ingenerare confusione le figure di cometa od altre consimili, provenienti dal rompersi delle cellule nel distendere il liquido sul vetrino coproggetti, specialmente se quello è molto denso. Ma queste forme, come pure gli ammassi colorati composti da fili granulosi irregolari, prodotti dalla precipitazione della materia mucosa, si imparano a riconoscere facilmente con un poco di esercizio.

c) *Conservazione dei preparati.* — I preparati si possono chiudere nel balsamo del Canadà, nella gomma damar, nella soluzione di acetato di potassa o finalmente nella glicerina.

Nel balsamo o nella damar si possono chiudere i preparati fatti con qualsiasi colore d'anilina. Dopo che si sono decolorati o semplicemente lavati coll'acqua, si lasciano essiccare e si conservano in una goccia di balsamo sciolto nella trementina, nella benzina o nel xilolo, non però nel cloroformio il quale scioglie facilmente i colori d'anilina. È necessario ricordare che in questi mezzi i microrganismi diminuiscono un poco del loro volume, sicchè se si vuole conservarli nella loro forma e grandezza naturale, come anche quando se ne vuol fare la fotografia, si debbono conservare nella soluzione concentrata d'acetato potassico (1 : 2), chiudendoli dopo averli decolorati, senza farli disseccare, e circondando il vetrino con un po' di mastice.

La glicerina non serve che pei preparati fatti coi colori bruni, giacchè scioglie gli altri colori d'anilina; pel bruno d'anilina è questo anzi il mezzo migliore di conservazione.

Esame del sangue.

La tecnica dell'esame microscopico di questo liquido, che è il più importante di quelli dell'organismo animale, merita realmente un posto a sè, essendo difficile a praticarsi ed offrendo una serie di particolarità piene d'interesse.

Noi dobbiamo qui prender di mira l'esame del sangue da un doppio punto di vista, e considerare anzitutto che nel sangue circolante normale esistono alcuni *elementi granuliformi*, provenienti dal disfacimento delle cellule sanguigne, i quali aumentano di numero in certi processi patologici, come ad esempio nella febbre e negli stati oligoemici, e che potrebbero dagli inesperti venir confusi coi microparassiti cocciformi. Ne informino a questo riguardo i famosi « granuli della sifilide » ed i pretesi microrganismi del veleno dei serpenti.

Ma v'ha ancora un altro fatto importante da menzionare, ed è che non tutte le malattie da infezione riconoscono la loro origine dai cosidetti « batteri »; sono già note alcune forme morbose infettive che si devono alla presenza di organismi patogeni, appartenenti ad un gradino più elevato della scala degli esseri viventi (*monadi* trovate da Lewis nel sangue dei ratti e dal Koch in quello dei topi di campagna), i quali sono assai simili alle cellule amiboidi del sangue normale.

Si deve alle ricerche dell'Ehrlich (1) e dei suoi scolari (2)

---

(1) L'Ehrlich ha fatto a questo riguardo numerose pubblicazioni nei seguenti giornali:

« Zeitschrift für klinische Medicin, Bd. I. Heft 3. 1880.
« Ibid. Bd. II. Heft. 3.
« Verhandlungen der phys. Ges. zu Berlin 1878-79. No. 20.
« Charité-Annalen. 1884.
« Deutsche medicinische Wochenschrift. 1883. No. 46 ».

(2) Westphall, *Ueber Mastzellen*. Dissert. Berlin 1880.
Schwarze, *Ueber eosinophile Zellen*. Dissert. Berlin 1880.
Spilling, *Ueber Blutuntersuchung bei Leukämie*. Dissert. Berlin 1880.
Einhorn, *Ueber das Verhalten der Lymphocyten zu den weissen Blutkörperchen*. Dissert. Berlin 1884.

la scoperta del fatto che gli elementi incolori del sangue, i quali esaminati così all'ingrosso sembrano tutti uguali, si comportano invece assai diversamente verso le varie sostanze coloranti; tanto che questo fatto, unitamente ad alcuni altri criteri differenziali, sta ad indicare un'origine ed un significato fisiologico diverso per ciascuna varietà degli stessi elementi.

L'Ehrlich ha trovato che ciò che differenzia siffatte varietà di corpuscoli bianchi non è tanto la forma o la grandezza, quanto il loro *contenuto granulare* protoplasmatico, il quale si comporta diversamente non solo di fronte alle varie sostanze coloranti, ma anche verso i mezzi dissolventi (acqua, acidi, alcool, glicerina ecc.) e verso gli alti gradi di temperatura; questi granuli hanno inoltre un diverso modo di distribuzione nel corpo della cellula ed hanno forma, grandezza e potere di refrazione ugualmente diversi. Tutte queste caratteristiche speciali hanno condotto l'Ehrlich ad ammettere che ciascuna specie di granulazioni ha origine nelle cellule ed è il prodotto di un'attività secretoria specifica degli elementi stessi, i quali perciò sono caratterizzati da questi granuli, come lo sono le cellule pigmentarie dai granuli di pigmento e le cellule cartilaginee dal glucogeno (Neumann).

Le cellule granulose dell'Ehrlich potrebbero venire facilmente scambiate, sia direttamente come tali, sia per le granulazioni che derivano dal loro disfacimento con elementi parassitari; tanto più che alcune specie di quelle si tingono coi colori basici d'anilina egualmente che i microrganismi. È interessante perciò di riassumere in breve le caratteristiche di ciascun gruppo degli elementi incolori del sangue e il modo di colorirli e di differenziarli gli uni dagli altri.

Non potendosi dare ancora una classificazione razionale sistematica di ciascuna specie di granulazioni, perchè non è ancora ben conosciuto il significato che hanno, bisogna attenersi alla divisione che ne ha fatto l'Ehrlich in 5 gruppi, basandosi sul diverso modo di comportarsi verso le materie coloranti d'anilina.

1° Cellule (o granulazioni) *eosinofile*. In queste i granuli sono grossi, rotondeggianti, fortemente rifrangenti la luce e

colorabili con tutti i colori acidi di anilina (composizioni in cui l'elemento colorante è rappresentato da un acido, es.: la eosina). Questi elementi, di origine mielogena, si trovano assai scarsi nel sangue umano normale ed abbondanti invece in quello leucemico e nei casi di alterazioni croniche degli organi emopoietici.

2° Cellule (o granulazioni) *anfofile*, le quali si colorano bene tanto coi colori acidi, come con quelli basici di anilina. Nell'uomo si trovano specialmente nel midollo delle ossa, nelle cavie e nei conigli sono fra i leucociti del sangue normale.

3° Cellule (o granulazioni) *basofile*, le quali si colorano, come i microparassiti, coi colori basici di anilina. Di queste cellule, cosidette dall'Ehrlich « Mastzellen », è parola più sotto a riguardo delle cause d'errore generali che possono aversi nella ricerca dei microrganismi. Le cellule basofile mancano nel sangue umano normale e si trovano invece nel sangue leucemico. Si trovano pure nel sangue normale degli animali inferiori, specialmente nei topi.

4° Cellule (o granulazioni) egualmente *basofile*, ma a granuli molto fini e contenenti un solo nucleo (*mononucleari*) grosso, ovoide, poco colorabile e circondato da una quantità di protoplasma relativamente piccola. Costituiscono la parte minore dei leucociti del sangue umano normale.

5° Gruppo-Cellule (o granulazioni) *neutrofile*, le quali si colorano coi colori neutri, con quei colori, cioè, che sono composti da due sostanze coloranti che fungono l'una da acido e l'altra da base. Questi elementi costituiscono la maggior parte dei leucociti del sangue umano normale e sono quasi tutti *polinucleari*. Aumentano di numero in tutte le forme di leucocitosi acuta.

Di queste specie di granulazioni, nei preparati trattati colle sostanze coloranti, si possono confondere coi microrganismi soltanto quelle del 3° e 4° gruppo e specialmente anzi le « Mastzellen », giacchè i granuli delle cellule del 4° gruppo si distinguono per la loro finezza eccessiva.

Volendo studiare nel sangue le granulazioni anzidette, se

ne prende una piccola goccia in un vetrino coproggetti, che si tiene con una pinzetta, e vi si pone sopra, prendendolo ugualmente colle pinze, un altro vetrino in modo che il sangue si distribuisca in istrato sottile fra i due coproggetti, che si distaccano poi l'uno dall' altro collo stesso mezzo. Non si devono toccare i vetrini colle dita, perchè il calore che emana da queste forma attorno al punto toccato un cerchio di evaporazione che altera la forma degli elementi rossi del sangue. I coproggetti così preparati si lasciano disseccare all'aria, e quindi una parte si fanno passare tre volte sulla fiamma e si colorano come d' ordinario per la ricerca dei microrganismi (le granulazioni in tal guisa si colorano poco); gli altri si fanno riscaldare a 120-130°C. per una ora ed anche più, per fissare l'emoglobina e le sostanze protoplasmatiche, e quindi si colorano coi colori basici d'anilina. Se si vogliono studiare accuratamente le granulazioni basofile, come anche per osservare le altre specie di granulazioni, si trattano i preparati coi metodi seguenti:

A) Per colorare le cellule *eosinofile* si usa questa miscela:

1 volume di soluzione glicerica satura di *aurantia* si mescola con 2 volumi di glicerina pura e vi si aggiunge *nero di anilina* ed *eosina* in eccesso, agitando ripetutamente fino ad averne una soluzione satura. Questo miscuglio colorante tinge gli elementi che contengono emoglobina in arancio intenso, i nuclei in grigio-scuro, quasi nero, e le granulazioni eosinofile in rosso o rosso scuro.

B) Per le cellule *neutrofile* si adopera un liquido così composto:

A 5 volumi di una soluzione satura di *fucsina acida* (rosanilinsulfosaures Natron) si aggiunge a poco a poco, ed agitando sempre, 1 volume di soluzione concentrata di *bleu di metilene* e 5 volumi di acqua distillata; si lascia a sè alcuni giorni e si filtra. I preparati di sangue, riscaldati a 120° C. e posti a contatto con questo liquido, mostrano i corpuscoli rossi colorati in rosso intenso e la gran maggioranza dei leucociti con finissime granulazioni colorate in violetto, le quali appaiono distinte soltanto coll'immersione omogenea.

Si può anche usare per lo stesso scopo un'altra miscela, proposta egualmente dall'Ehrlich, composta *di fucsina acida* e *di orange* (G), mescolati *con verde di metile*. Si mescolano 125 ccm. di soluzione acquosa satura di orange con altrettanto di soluzione satura di fucsina acida nell'alcool al 20 %; vi si aggiungono 75 ccm. di alcool assoluto e finalmente vi si mescolano, a poco a poco ed agitando, 125 ccm. di soluzione acquosa satura di verde di metile. Si lascia a sè la soluzione qualche tempo prima di adoperarla. Si vede allora che si è formato un precipitato al fondo del recipiente ed una pellicola alla superficie del liquido; per prendere la soluzione limpida, si introduce una pipetta, chiusa col polpastrello di un dito alla sua estremità, nel mezzo del liquido e se ne prende quella quantità che si desidera. Bisogna badare a che tanto la pipetta quanto i recipienti che devono contenere questo liquido sieno bene asciutti, altrimenti si forma di nuovo un precipitato. In siffatto miscuglio i corpuscoli rossi assumono un colore giallo-arancio, i nuclei una tinta verdastra, le granulazioni neutrofile un colore violetto e quelle eosinofile un colorito grigio-scuro tendente al bleu.

Finalmente havvi ancora un'altra miscela colorante, recentemente proposta dall'Ehrlich per la dimostrazione delle cellule sanguigne. Si mescolano insieme 100 ccm. di acqua, 100 ccm. di glicerina e 100 ccm. di alcool assoluto; vi si aggiunge 1-2 gr. di ematossillina, allume fino a saturazione, 1 gr. di eosina e 10 ccm. di acido acetico. Si ottiene in tal guisa una colorazione rossa intensa nei corpuscoli rossi, bleu nei nuclei dei leucociti polinucleari e grigio-scura in quelli dei mononucleari; il protoplasma dei leucociti grossi e di quelli polinucleari appare tinto in roseo e quello dei mononucleari tinto in grigio-scuro.

Bisogna ricordare in fine che nelle cellule bianche, allorchè sono in movimento attivo di scissione, i nuclei possono formare coi loro prolungamenti che si intrecciano figure simili a quelle di certi microparassiti. Così l'Ehrlich ha trovato nel protoplasma delle cellule neutrofile, contenute nel sangue di individui che erano in preda a forte febbre, numerose figure filiformi, perfetta-

mente somiglianti a frammenti di spirilli, le quali si comportavano riguardo ai colori d'anilina come i nuclei.

L'importanza di questi metodi di esame dei corpuscoli sanguigni per la ricerca dei microparassiti nel sangue è adunque grandissima, ed è indispensabile di averne cognizione e di impratichirsene, per evitare così molte cause d'errore.

Ricerca dei microrganismi nei tessuti.

Molte cose già dette a riguardo della ricerca nei liquidi valgono ugualmente anche per i tessuti, ed è inutile ripeterle; ond'è che accenneremo soltanto alle differenze ed a ciò che vi è di speciale nell'esame dei tessuti. Qui è necessario aiutarsi coi reagenti anche più che nei liquidi, giacchè si tratta di parti organizzate la cui tessitura, più o meno densa e compatta, serve a nascondere facilmente le forme delicate dei microparassiti che vi possono essere contenute, ed il semplice esame microscopico diretto può servire tutt'al più a far distinguere le zooglee. Il metodo migliore, e direi anzi l'unico, per preparare i tessuti per tali ricerche è quello di farne sezioni. Si è già parlato degli istromenti speciali (microtomi) che si adoperano per ciò; ora esporremo i dettagli relativi al modo di preparare i tessuti per poterli sezionare, allo spessore delle sezioni ed al successivo trattamento delle stesse.

Indurimento dei tessuti.

L'*alcool* è il miglior mezzo per rendere consistenti gli organi nei quali si vuol fare la ricerca dei microrganismi; e siccome i tessuti devono indurirsi in breve tempo, bisogna usare sin da principio l'alcool assoluto o per lo meno un alcool assai concentrato (90-95 $^0/_0$). Si preparano perciò piccoli pezzi degli organi appena

estratti e si pongono in un vaso con molto alcool, usando l'avvertenza di coprire il fondo del vaso con un poco d'ovatta o di carta da filtro: questo si fa nel triplice scopo che i pezzi sieno circondati per ogni parte dal liquido, che non sieno a contatto coi detritus organici e col sangue che si separa dai tessuti e finalmente che si trovino immersi nell'alcool più puro, giacchè l'acqua che viene ceduta dai tessuti tende naturalmente a raccogliersi al fondo. Si deve fare in modo che *in uno o due giorni i pezzi abbiano acquistato la consistenza necessaria per essere sezionati*, perchè alcuni microbi già dopo un soggiorno di 3-4 giorni nell'alcool perdono la proprietà di combinarsi coi colori d'anilina.

Invece dell'alcool si può usare la soluzione di acido cromico o dei suoi sali ed i vapori di acido osmico, ponendo la soluzione di quest'acido sul fondo del vaso e il pezzo da indurire attaccato al sughero che serve per chiuderlo. Questo metodo è semplicissimo ed è anche economico, stante il prezzo piuttosto elevato dell'acido osmico. Questi ultimi mezzi però sono meno adatti del primo pel caso nostro, sia perchè colorano in pari tempo i tessuti, sia anche perchè rendono più difficile la colorazione di certi microbi. Così il Koch (1) afferma che, conservando gli organi tubercolosi nelle soluzioni cromiche, i bacilli perdono la facoltà di colorarsi. Il Baumgarten (2) invece sostiene di avere ottenuto bellissime colorazioni degli stessi bacilli da pezzi fatti indurire prima nella soluzione di Müller e quindi nell'alcool. Quando i tessuti sono stati induriti con siffatti reagenti che in pari tempo li colorano, bisogna, prima di porre le sezioni a contatto dei colori d'anilina, lavarle coll'acqua distillata e porle quindi di nuovo nell'alcool assoluto. I preparati induriti coll'acido osmico si colorano talora più facilmente coll'ematossilina che coi colori di anilina.

---

(1) Koch, *Die Aetiologie der Tuberkulose*, Mitth.a. d. kais. Ges. Bd. II, p. 1-88.

(2) Baumgarten, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie, Bd. I, Heft. 3, p. 453.

Una volta che il tessuto abbia acquistata una consistenza sufficiente, si pone nella morsa del microtomo per farne sezioni nel modo già esposto. L'inclusione in paraffina sarebbe assai comoda e semplice, ed è anzi la più adatta per ottenere sezioni sottili: però in alcuni casi la disidratazione necessaria e la penetrazione nei tessuti degli olii eterei e della paraffina liquefatta rende più difficile la colorazione di alcune specie di microparassiti.

Con tutto che l'alcool sia finora il mezzo d'indurimento riconosciuto più adatto per lo scopo presente, non deve credersi però che sia un mezzo egualmente indifferente per tutte le specie di microparassiti; quindi è che in caso di studi e di ricerche che si fanno la prima volta è da consigliarsi di usare contemporaneamente anche l'acido cromico e l'acido osmico, specialmente quando si vogliano in pari tempo fissare in modo sicuro alcune particolarità delicate di struttura, ad es., la cariocinesi.

Anche trattandosi della ricerca nei tessuti, come nei liquidi, non si deve mai possibilmente trascurare l'esame degli organi allo stato fresco, giacchè vi sono alcuni microparassiti i quali, dopo essere stati trattati coi reattivi induranti, non sono più suscettibili di colorazione che difficilmente. Tali sono ad esempio i bacilli del tifo di Eberth, i quali si colorano facilmente soltanto nei pezzi freschi.

Questo genere di esame era poco praticato per lo addietro, per la difficoltà di fare sezioni sottili degli organi freschi; fortunatamente però ora si possiede il mezzo di ovviare anche a tale difficoltà coi microtomi a congelazione. Dei vantaggi di questo metodo si è già parlato; qui mi resta da aggiungere soltanto che la forma dei microparassiti in tal modo non si altera, ma l'apparenza dei tessuti si modifica alquanto, perchè il fenomeno del congelamento e del successivo disgelo determina nel parenchima la formazione di vacuoli.

Si consiglia perciò di porre le sezioni congelate dapprima nella soluzione indifferente di cloruro sodico e di immergerle quindi lentamente nell'alcool assoluto, lasciandovele finchè si sono svolte tutte le bolle d'aria contenute nei vacuoli anzidetti: da questo si passano poi nella soluzione colorante. Anche qui giova ripetere la regola generale di far passare in ogni caso, quando si vuole ottenere la colorazione dei microparassiti colle tinte d'anilina che non sieno le brune, le sezioni dall'alcool assoluto direttamente nelle soluzioni coloranti, anche se prima erano nell'acqua o in qualunque altro liquido.

Trattamento successivo delle sezioni.

Fatte le sezioni, si può anche qui porre in giuoco l'azione dei reattivi dissolventi (acido acetico concentrato, soluzioni di soda

e di potassa diluite); ed è questo un metodo che dà talora buoni risultati. Il Baumgarten è riuscito con tal mezzo a porre in evidenza i bacilli tubercolari in mezzo ai tessuti. È preferibile però sempre ricorrere alla colorazione delle sezioni stesse coi colori d'anilina nei modi già descritti.

Lo *spessore* delle sezioni che si devono colorire deve in generale essere sottile, giacchè si tratta per lo più della ricerca di oggetti che hanno dimensioni piccolissime e che si trovano in mezzo agli elementi istologici, dai quali possono essere facilmente nascosti. Tuttavia è talora necessario anche un certo spessore delle sezioni; e questo è utile specialmente quando i microparassiti sono in numero scarso, perchè allora si possono esaminare in pari tempo parecchi strati del tessuto ed è più facile il rintracciarli.

Usando il microtomo, si ha il grande vantaggio di poter ottenere per le singole sezioni lo spessore che si desidera e che è più conveniente in ciascun caso. Per dare una media, utile per chi comincia e non sa quale spessore deve dare alle sue sezioni, dirò che degli organi freschi è sufficiente per lo più uno spessore di 0,05 mm., mentre invece degli organi induriti le sezioni devono essere sempre più sottili e in media di 0,01-0,03 mm.

I dettagli relativi alla colorazione dei microrganismi nei tessuti sono contenuti nella descrizione dei metodi generali di Weigert, di Gram etc., e sono press'a poco gli stessi di quelli che si usano pei preparati dei liquidi essiccati.

Esiste tuttavia qualche lieve differenza, giacchè il numero delle sostanze coloranti le quali servono per la colorazione delle sezioni è molto minore che pei preparati dei liquidi: così, a mo' d'esempio, l'eosina che si può usare per questi ultimi non dà mai una colorazione differenziale dei microbi nei tessuti. Un'altra differenza sta pure in ciò, che mentre i preparati secchi si possono, una volta colorati, lavare semplicemente coll'acqua per osservarli al microscopio, pei tessuti è necessaria sempre la decolorazione successiva.

E pure da notare che il modo di comportarsi dei microparassiti verso le sostanze coloranti, dopo l'azione dell'alcool, è diverso da quello che si osserva nelle preparazioni fresche e nei liquidi essiccati. Così lo « spirochete » del tifo ricorrente si colora bene col violetto di metile o di genziana e colla fucsina, quando si tratta di sangue disseccato sui coproggetti, mentre invece non si colora colle stesse sostanze nei tessuti induriti coll'alcool; in questo caso servono invece i colori bruni d'anilina, per quanto anche con questi lo spirochete si colori debolmente. Al contrario invece, secondo il Koch, si comportano i bacilli della lebbra, i quali si colorano bene sui coproggetti, appena dopo essiccati, e diventano invece refrattari alla colorazione, se sono stati disseccati da qualche tempo: nei tessuti induriti nell'alcool gli stessi bacilli si colorano benissimo, anche dopo molto tempo, colla fucsina, col violetto di metile e con quello di genziana e non si colorano coi colori bruni. Il Baumgarten (1) invece asserisce di aver colorato bene colla soluzione semplice di fucsina i bacilli della lebbra in preparati essiccati già da 40 giorni.

I bacilli tifosi ho già detto che perdono in parte nell'alcool la loro affinità pei colori d'anilina. Per tutti questi bacilli, addivenuti *refrattari* all'azione delle sostanze coloranti, giova riscaldare la soluzione colorante stessa a 40-50° C. Difatti è con questo mezzo che il Friedländer è riuscito a colorire i bacilli tifosi anche nell'intestino indurito nell'alcool.

Le sezioni di tessuti, dopo essere state colorate e trattate quindi colle soluzioni decoloranti o coll'alcool assoluto semplicemente, si schiariscono col mezzo degli olii essenziali di garofani, di trementina, di origano, di bergamotto o di legno cedrino, e quindi si conservano nella gomma damar o nel balsamo del Canadà sciolto nella benzina, nel xilolo o nella trementina. La glicerina ed il miscuglio di glicerina e gelatina, proposto dal Klebs (2), sono adatti a conservare soltanto i preparati tinti coi colori bruni.

Il Wedl (3) ha recentemente proposto per conservare i preparati microscopici la *levulosa*, di cui vanta i pregi sia pel suo notevole potere rischia-

---

(1) Baumgarten, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie Bd. I, Heft 3, p. 368.

(2) Il miscuglio di glicerina e gelatina si prepara nella seguente maniera: si fanno macerare nell'acqua distillata 10 gr. di gelatina finissima finchè si è rigonfiata: si decanta l'eccesso di liquido e vi si aggiungono 10 gr. di glicerina, con qualche goccia di soluzione di acido fenico o di timolo per impedire lo sviluppo delle muffe. Raffreddandosi questa miscela si coagula; ma basta riscaldarla leggermente, perchè si liquefaccia e si possa così adoperare.

(3) Wedl, Virchow's Archiv., Bd. 71, p. 128, e Bd. 74, p. 143.

rante, come specialmente pel fatto che lo impiego di questa sostanza non richiede, come quello del balsamo, la disidratazione dei tessuti; cosa che permette di applicarla alla conservazione dei preparati, fatti con sostanze coloranti facilmente solubili nell'alcool. Se poi il preparato è stato precedentemente decolorato coll'alcool, non si ha che lavarlo bene con acqua distillata per poi rinchiuderlo in levulosa. La preparazione però di questo prodotto è piuttosto difficile, ed il Wedl si serve della levulosa preparata dal Dr. Schorn di Vienna (Hundsthurmerstr. 113).

Debbo dire finalmente che per conservare la colorazione nei bacilli tubercolari, la quale è noto che scompare in breve tempo, si è proposto con vantaggio il semplice balsamo del Canadà, liquefatto col calore e disteso sul preparato anche senza vetrino. Però io ho avuto occasione più volte di osservare che non è tanto il balsamo (il quale non deve mai essere sciolto nel cloroformio) che vi ha influenza, quanto i residui dell'acido che si adopera per la decolorazione col metodo Koch-Ehrlich, giacchè in quei casi in cui ho avuto cura di lavare dopo la decolorazione accuratamente il preparato, questo ha conservato il suo colore anche per parecchi mesi.

Riassumendo, le cautele più importanti necessarie per fare e conservare buoni preparati dei microrganismi, sia nei liquidi come nei tessuti, si possono esporre in breve nelle proposizioni seguenti:

a) I preparati devono, prima di esser portati nella soluzione colorante, essere tenuti nell'alcool assoluto e non nell'acqua. Se fu necessario porli in altri liquidi, bisogna sempre riportarli nell'alcool immediatamente prima di farli colorire.

b) L'alcool che si adopera per la decolorazione o per la disidratazione non deve contenere traccie di acidità.

c) Si deve evitare un soggiorno troppo prolungato nell'olio di garofani, oppure usare invece altri olii eterei per ischiarire.

d) Il balsamo o la damar non devono essere sciolti nel cloroformio, ma sibbene nella benzina, nella terebentina o nel xilolo, in soluzione piuttosto concentrata.

Microfotografia.

A questo mezzo di riprodurre i preparati, senza dubbio il più fedele di tutti per la esatta rappresentazione dell'imagine microscopica, il Koch ha voluto attribuire un'importanza fors'anco

esagerata, ammettendo che per istituire confronti con fondamento di verità sia indispensabile l'applicazione d'un tal mezzo e che le differenze d'opinione, che esistono ancora in iscienza sulla dottrina dei microparassiti, sieno in massima parte dovute alla trascuranza dello stesso da parte degli osservatori.

I vantaggi che offre la fotografia, rispetto ai metodi ordinari di riproduzione delle imagini osservate al microscopio, sono invero di non poco momento. È noto infatti che sono moltissime le condizioni che fanno variare l'aspetto dell'imagine microscopica: un diaframma più largo o più stretto, un oculare più o meno forte, una maniera diversa di fare e di colorire il preparato, il trovarsi questo rinchiuso in liquidi di diverso potere rifrangente, e così via, sono altrettante circostanze che fanno variare sensibilmente l'imagine dello stesso preparato; e nel caso nostro, trattandosi di oggetti così minuti e delicati come i microrganismi, possono farceli apparire ora più grossi, ora più sottili, ed anche sotto aspetti tanto differenti da farli ritenere diversi, oppure possono anche nasconderli affatto alla nostra osservazione.

In questi casi è assai difficile di potere rintracciare in quale delle circostanze anzidette si trova la causa dell'errore, di vedere, cioè, se si deve al microscopio, oppure al modo di fare il preparato, il diverso apparire d'un medesimo oggetto.

Ad ovviare a tale inconveniente serve benissimo la microfotografia, perchè questa riproduce sempre l'imagine esattamente nella stessa posizione, ingrandimento ed illuminazione in cui fu presa: si può allora quel dato oggetto misurare, disegnare e confrontare con altri fotogrammi, per vedere così in quali condizioni diverse fu riprodotta l'imagine stessa negli altri casi. A ciò aggiungi che il preparato per essere riprodotto fotograficamente dev'essere fatto, colorito e rinchiuso sempre in una determinata maniera.

Un altro vantaggio incontestabile consiste in ciò, che nella fotografia l'oggetto si riproduce da per sè e non è riprodotto dalla mano di chi osserva, il quale per lo più tende involontariamente ad abbellire ed a rendere l'imagine più dimostrativa per qualche veduta teorica che può benissimo avere in mente. La ri-

produzione fotografica invece è la più fedele che si possa imaginare e permette ad un osservatore di potere controllare i risultati ottenuti da un altro in lontananza, come se avesse sott'occhio lo stesso preparato microscopico.

Questo è forse il vantaggio più rilevante per la scienza, perchè non v'ha dubbio che il sapere che i preparati possono essere veduti quali sono, e controllati da tutto il mondo scientifico, costringe il microscopista a sottoporre a prove e riprove l'esattezza delle sue osservazioni, prima di comunicarle al pubblico; cosa che in questi ultimi tempi, specialmente in Italia, ci avrebbe risparmiato un gran numero di pubblicazioni fatte su questi argomenti molto alla leggiera.

Per citare un esempio, riferito dal Koch per dimostrare la importanza della fotografia nello studio dei microparassiti, dirò che il Lewis (1) avea descritto una forma di spirochete nel sangue dei malati di tifo ricorrente nell'India, avente uno spessore più grande di quella corrispondente, osservata in Europa dall'Obermeier e da altri. Si erano ammesse così due varietà di spirochete, l'indiano e l'europeo, corrispondenti a due forme diverse della stessa malattia. Orbene il Koch, confrontando le fotografie dei preparati microscopici dello spirochete indiano, fatte da Lewis, con quelle dei preparati propri, ha potuto constatare che i primi erano stati riprodotti con diaframmi più stretti, i quali, come è noto, fanno risaltare assai i contorni degli elementi, e che si era data in tal guisa al microparassita l'apparenza di uno spessore maggiore di quello riprodotto dal Koch. Difatti quest'ultimo, essendosi poi procurato gli spirocheti indiani, li ha fotografati nelle stesse condizioni dei suoi e li ha ottenuti riprodotti nella stessa forma e colla stessa grandezza di quelli europei.

Finalmente la fotografia è utile anche perchè riproduce la imagine microscopica meglio e con dettagli più minuti di quelli a cui può essere sensibile la retina del nostro occhio. Difatti la lastra sensibile fotografica è una specie di occhio, il quale però non si restringe colla luce viva, non si stanca a distinguere le piccole differenze di luce e non è turbato nell'osservazione dagli intorbidamenti del vitreo. E che sia più sensibile dell'occhio stesso

---

(1) Lewis, *The microscopics organism found in the blood of man and animals*, Calcutta, 1879.

lo dimostra il fatto che talora oggetti finissimi, ad esempio le ciglia di alcuni microbi, i quali sfuggirono all'osservazione più accurata si sono trovati invece riprodotti nell' imagine fotografica.

Di fronte a questi vantaggi incontestabili, la riproduzione microfotografica ha però l'inconveniente di essere difficile a praticarsi ed assai costosa; non credo quindi che si possa sperare che la sua applicazione addivenga generale, finchè almeno non si sia trovato il mezzo di semplificarla tanto da metterla alla portata di tutti.

La riproduzione fotografica dei microrganismi non differenzia essenzialmente da quella degli altri preparati microscopici, per cui qui accenneremo soltanto alle norme principali relative al caso speciale. I preparati, coloriti e conservati nel modo già esposto, possono essere fotografati anche coi più forti ingrandimenti degli obbiettivi ad immersione omogenea; i preparati secchi sui vetrini si riproducono colla fotografia assai più facilmente dei preparati in sezioni.

Il modo di aggiustare il microscopio è quello stesso che serve a dare la imagine più chiara e più netta dell' oggetto per l' osservazione oculare: quindi la stessa illuminazione colla luce diffusa, o riflessa dalle nubi bianche, e non la luce solare diretta. Perchè la riproduzione fotografica degli oggetti colorati riesca bene, è necessario anzitutto che questi sieno impregnati di un tal colore che non lasci passare i raggi chimici dello spettro, che assorba la luce bleu e che agisca sulla lastra sensibile come un colore oscuro. Sono adatti perciò i colori bruni ed i gialli, e siccome non tutti i microparassiti posseggono affinità per tali sostanze, così questo è pure uno dei gravi inconvenienti del metodo in discorso.

Un mezzo semplice e spiccio per la scelta del colore giusto, adatto per la riproduzione fotografica, è quello di esaminare il preparato nella luce monocromatica bleu, ossia nella luce che è passata attraverso una soluzione di ammoniuro di rame, nel qual caso i microbi ed i nuclei (se anche questi sono colorati) devono apparire più o meno scuri su fondo bleu.

Fa d'uopo adoperare il condensatore dell'Abbe e diaframmi larghi, in modo che scompaia l'imagine di struttura del preparato.

È quasi inutile che aggiunga che si deve assolutamente evitare qualsiasi ritocco o modificazione, sia della negativa che del ritratto, anche se la riproduzione non riuscì perfetta. I preparati fotografati appaiono anzi sempre confusi, poichè viene riprodotto un solo strato di quelli e gli altri, che non sono in foco, dànno semplicemente un'imagine sfumata in grado diverso, a seconda che sono situati più o meno distanti dallo strato riprodotto.

CAPITOLO V

Ricerche nell'aria, nell'acqua e nel terreno.

L'influenza che esercita l'ambiente in cui viviamo, ossia l'aria, l'acqua ed il terreno, sull'insorgere di certe malattie, specialmente sullo sviluppo di quelle cosidette « infettive », non era sfuggita all'osservazione dei medici fino dai tempi più remoti; e di quest'influenza, indicata dapprima in modo vago e indeterminato, si era puranco tentato di rintracciare le cause nelle proprietà inerenti ai mezzi stessi in cui viviamo. Quindi, secondo le teorie che dominarono nelle varie epoche sulla natura dei morbi infettivi, e secondo la maggiore o minore importanza attribuita al contenuto di umidità e alla temperatura dell'aria, al contenuto di materiali inorganici dell'acqua ed alle emanazioni gazose del terreno, si erano prese specialmente in esame le proprietà fisiche e chimiche di questi mezzi.

In seguito però si è riconosciuto che siffatte proprietà dell'aria, dell'acqua e del terreno non sono direttamente attive nel produrre le malattie, ma agiscono per via indiretta, esercitando un influsso su certi processi di decomposizione delle sostanze organiche; sicchè l'influenza loro, nociva per la salute del nostro organismo, dipende specialmente dalla quantità e qualità dei prodotti delle stesse decomposizioni. Si studiarono perciò quali erano le condizioni favorevoli a quei processi e quali i loro prodotti, misurando il quantitativo di anidride carbonica nell'aria e il contenuto di sostanze organiche, ammoniaca, acido nitrico, ecc., nell'acqua. Si era fatto così un gran passo in avanti, e lo dimostrano

invero i risultati importantissimi ottenuti da tali studi per opera di eminenti osservatori, a capo dei quali sta il Pettenkofer.

Ma quando finalmente Schwann e Cagniard Latour ebbero dimostrato che i processi di fermentazione e di putrefazione non dipendono soltanto dalla presenza dell'ossigeno dell'aria atmosferica, ma che è necessario eziandio per la produzione degli stessi l'intervento di elementi organizzati, i quali moltiplicandosi dànno luogo a decomposizioni speciali del mezzo in cui vivono; e quando fu più tardi stabilita sopra solide basi la dottrina del « contagio vivente » per l'origine di alcune malattie, allora di necessità l'attenzione fu rivolta, oltrechè ai prodotti della decomposizione, anche e specialmente agli elementi produttori, ossia ai microrganismi. In questi ultimi tempi poi il numero delle osservazioni sul proposito si è straordinariamente moltiplicato, e l'importanza dei microrganismi per l'origine delle malattie da infezione va crescendo ogni giorno di più. È indispensabile adunque, per poter giudicare delle proprietà nocive dell' aria, dell'acqua e del terreno, di ricercare e studiare a lato delle proprietà fisiche e chimiche di questi mezzi anche il contenuto di germi organizzati, che vi esistono in isvariate circostanze.

Ricerca dei microrganismi nell'aria.

Le prime ricerche, relative alla qualità e alla quantità dei germi che si contengono nell'aria atmosferica, sono strettamente connesse collo studio della questione della generazione spontanea; ed i metodi primitivi, applicati alla statistica micrografica dell'aria, consistevàno nella filtrazione dell'aria stessa attraverso il cotone solubile (fulmicotone), il quale veniva sciolto nell'etere ed esaminato direttamente al microscopio (Pasteur). In seguito per raccogliere i costituenti solidi dell'aria si applicarono gli *aeroscopi*, e primo il Pouchet si servì di questo apparecchio, formato da un cilindro di vetro di piccole dimensioni, posto in comunicazione per mezzo d'un tubo di gomma con un aspiratore; una lastra di

vetro spalmata di glicerina, situata nella parte inferiore del cilindro, riceve il getto d'aria prodotto dall'aspirazione, la glicerina trattiene i corpuscoli natanti dell' aria e questi vengono quindi osservati al microscopio e contati. Con questo apparecchio fecero le prime ricerche sui germi dell'aria atmosferica il Pouchet, il Maddox ed il Cunningham. Il Miquel (1) ha modificato alquanto l'aeroscopio del Pouchet, usando però ugualmente la lamina di vetro, spalmata con un miscuglio di glicerina e di glucosio, per raccogliere le particelle solide contenute in una data quantità di aria ed esaminarle quindi al microscopio, determinandone il numero. Il Miquel ha continuato queste ricerche nell'osservatorio di Montsouris per parecchi mesi di seguito, cercando in tal guisa di determinare le leggi che regolano la comparsa ed il numero dei microbi nell'aria.

Questo metodo grossolano, poco adatto ad enumerare con esattezza anche i grossi germi dei microfiti più elevati (muffe), non potea essere menomamente applicato alla ricerca dei così detti *batteri*, giacchè la loro estrema sottigliezza e il loro debole potere di refrazione li faceva scomparire nel liquido che serviva a fissarli negli aeroscopi. Il Miquel ha quindi usato perciò un altro metodo: ha fatto gorgogliare l'aria attraverso liquidi di nutrizione, adatti allo sviluppo dei microrganismi, nell'intento di farveli moltiplicare e determinarne quindi la specie ed il numero. Simile a questo è pure il processo posto in opera dal Miflet (2) e dal Fodor, i quali pure si sono occupati attivamente dello stesso argomento.

Il D.re Emmerich (3) ha migliorato in seguito l'aeroscopio di Pouchet e di Miquel, dando al tubo che contiene il liquido nutritivo, nel quale l'aria passando deve depositare i suoi

---

(1) Miquel, Annuaire de l'Observatoire de Montsouris pour les ans 1879-1882. — *Des Organismes vivants de l'atmosphère*, Gauthier-Villars, Paris 1883. Thèse du doctorat de la Faculté de médecine de Paris.

(2) Miflet, *Untersuchungen über die in der Luft suspendirten Bacterien*, Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. III, p. 119.

(3) Emmerich, Archiv für Hygiene. Bd. I, 1883, 5, 169.

germi, una forma a spirale, per far sì che l'aria stia a contatto col liquido per un tempo sufficientemente lungo, a che i germi che vi sono contenuti rimangano tutti nel mezzo di nutrizione.

Però tanto il metodo primitivo della ricerca microscopica semplice, quanto questi ultimi di Miquel, di Emmerich e di Fodor sono mal sicuri ed incompleti. La semplice osservazione microscopica, oltrechè fornisce nel conteggio un' approssimazione molto lungi dal reale, non ci istruisce per nulla sulla facoltà di sviluppo, vale a dire sulla vitalità dei germi che si osservano, mentre è questa appunto la proprietà più interessante a conoscersi dal punto di vista dell'igiene.

Anche gli altri metodi di ricerca, i quali si propongono di far depositare i germi dell'aria nei liquidi nutritivi, non raggiungono lo scopo, perchè non tengono conto di certe particolarità speciali, inerenti allo sviluppo ed al modo di crescere dei microrganismi. Intendo alludere qui specialmente alla cosidetta *concorrenza*, che è quasi una vera lotta per la vita che combattono fra loro le varie specie di microbi, allorchè debbono svilupparsi in un medesimo mezzo di nutrizione. Difatti questi esseri non si sviluppano tutti in modo eguale ed uniforme, ma si moltiplicano invece qual più qual meno rapidamente; non sono inoltre tutti egualmente mobili, ma sibbene alcuni sono dotati di movimenti vivacissimi ed altri invece ne sono affatto privi. Se adunque nel miscuglio dei germi deposti dall'aria nei liquidi nutritivi ve n'ha una specie che possiede uno sviluppo più rapido, questa prende il sopravvento sulle altre, le quali perciò, siccome non si moltiplicano, sfuggono facilmente all'osservazione e non possono quindi venire enumerate. Oppure, anche se si sviluppano tutti uniformemente, accadrà sempre che le forme mobili si mescoleranno colle altre, risultandone un vero caos di figure, nelle quali riesce impossibile raccapezzarsi per distinguerle ed enumerarle singolarmente. E così anche, se coll'aria vengono depositati i germi delle muffe (*Schimmelpilze*), capaci di svilupparsi in quei liquidi, viene impedito lo sviluppo dei cosidetti « batteri », perchè i primi col riprodursi consumano l'ossigeno contenuto nel

liquido stesso. A ciò aggiungi che, passando l'aria attraverso i liquidi sotto forma di bolle, non può mai depositarvi tutti i germi che contiene.

Queste cause d'errore sono invero così considerevoli, che tolgono quasi ogni valore scientifico alle ricerche istituite coi soli processi anzidetti, non potendosi attribuire alle cifre statistiche, ottenute in quel modo, neppure un significato d'approssimazione.

La più gran parte degli errori suaccennati potè essere eliminata sostituendo ai liquidi i mezzi solidi di nutrizione del Koch, sui quali i germi dell'aria si depositano separati gli uni dagli altri e separatamente si sviluppano ognuno da sè. In tal modo le specie mobili non si mescolano più colle immobili, quelle a sviluppo più rapido non molestano le altre nel loro accrescimento, ed ognuna può prendere liberamente l'ossigeno di cui abbisogna, sviluppandosi anzitutto sulla superficie solida del mezzo che la nutrisce. Questi vantaggi delle materie di nutrizione solide sono di tanta importanza, che io non esito ad affermare che tutte le osservazioni precedenti devono essere rifatte di bel nuovo, applicando al metodo cotesta modificazione.

Per convincersi di quanto si è adesso accennato, serve una esperienza semplicissima; una patata cotta nel vapor d'acqua a 100°, tagliata per metà con un coltello sterilizzato e lasciata per qualche tempo colle due superficie di sezione esposte all'aria, appare dopo un certo tempo coperta di punti, di goccioline e di miceli di funghi, ognuno dei quali ha un aspetto diverso per forma, colore, grandezza e contorni e costituisce una cultura isolata di una data specie di microrganismi, come si può facilmente riconoscere coll'esame microscopico.

I germi ed i microbi contenuti nell' aria non sono poi così leggeri come una volta si credeva, e se l'aria non è in movimento, si depositano facilmente. Valendosi di questa proprietà si possono raccogliere questi germi sulla superficie di sezione delle patate, come ora si è detto, giacchè queste offrono un terreno molto adatto allo sviluppo degli stessi. Dopo avere tenuto le patate per qualche ora esposte all'aria, si racchiudono in uno spazio

umido, in una campana doppia di vetro colle pareti rivestite di carta da filtro bagnata, e si osserva quindi lo sviluppo delle colonie.

Molto più adatto però per questo genere di ricerche è l'infuso di carne con gelatina (V. capitolo seguente), disposto nei recipienti in larga superficie. La gelatina è infatti più facile a maneggiarsi, si può preparare in quella forma che meglio si desidera e finalmente offre il grande vantaggio di permettere l'osservazione microscopica immediata delle colonie che vi si sviluppano, le quali perciò possono essere seguìte a passo a passo nel loro accrescimento coll'osservazione diretta.

La prima cosa interessante da determinarsi nelle ricerche micologiche dell'aria atmosferica è il numero degli esseri viventi che questa contiene in un dato volume; giacchè interessa sommamente di poter fare confronti dell'aria di diverse località, ed anche di quella dello stesso luogo in varie condizioni di stagione, di temperatura e così via.

A tale oggetto si è cercato di filtrare, coll'aiuto di un aspiratore, attraverso il cotone sterilizzato una certa quantità di aria e di mescolare quindi il cotone, carico di microbi e dei loro germi, colla gelatina nutritiva, per osservarne lo sviluppo e poterli così enumerare. Ma questo metodo non può dare cifre esatte, perchè un certo numero di colonie rimangono coperte dai filamenti del cotone, ed anche perchè nell'interno della gelatina, lungi dal contatto dell'aria, molti germi non si sviluppano affatto o crescono assai lentamente.

Parimenti insufficiente è l'altro processo di ricerca che consiste nello spingere l'aria aspirata contro una goccia di glicerina, o contro una lastra di vetro spalmata d'un miscuglio di glicerina e gelatina, poichè è stato dimostrato che la glicerina è innocente per le spore dei bacilli e delle muffe, ma uccide invece i micrococci: nè si può d'altronde usare la sola gelatina, stantechè questa per opera del getto d'aria si dissecca rapidamente ed allora non è più adatta a trattenere i microbi.

Il Koch ha pensato perciò di lasciarli depositare sulla ge-

latina dall'aria lasciata in quiete, adoperando un apparecchio semplicissimo, il quale permette di enumerare i germi che vengono depositati in un dato tempo da una colonna d'aria, press'a poco sempre eguale. Questo metodo permette così di fare confronti, ed in pari tempo dà agio di fare l'osservazione microscopica diretta delle colonie che si sviluppano sulla gelatina, senza guastarle menomamente.

L'apparecchio (fig. 13) consiste in un vaso di vetro cilindrico, alto 18 cm. e largo 6, nel fondo del quale si trova una scatola pure di vetro, a fondo piatto, avente un diametro di 5,5 cm. ed un'altezza di 1 cm. circa. Questa scatola, destinata a contenere la gelatina e quindi le colonie, si può levare e mettere a posto facilmente per mezzo di una lastra d'ottone, lunga quanto è l'altezza del cilindro e ripiegata in fondo ad angolo retto per sostenere la scatolina di cristallo.

Per potere eseguire una serie di ricerche sui microrganismi dell'aria, è necessario avere almeno una ventina di questi vasi, i quali devono essere anzitutto accuratamente sterilizzati. Si ottura perciò il cilindro, nel quale si è già posta la scatolina di vetro e la lastra d'ottone, con un grosso piumacciolo di cotone e si sterilizza nella stufa a calore secco a 150° C. per una o due ore: si lascia raffreddare e quindi si toglie con cautela il turacciolo, si solleva fino all'orlo del cilindro la scatola di vetro e vi si versa 0,5 cm. di gelatina fluidificata, richiudendo quindi il vaso colla maggiore sollecitudine. Se nei pochi momenti di tempo, necessario per questa operazione, qualche germe dell'aria cade nella gelatina ancora fluida, si mescolerà con questa e non turberà per nulla i risultati delle ricerche; giacchè tali germi si svilupperanno nell'interno della gelatina e non sulla superficie, come accade di quelli che vengono ivi depositati dall'aria che si vuole esaminare.

Fig. 13.

Appena la gelatina si è solidificata, se si vuole, si può subito portare il vaso nella località ove si desidera di fare le ricerche;

si tolgono i piumaccioli di cotone, i quali devono essere conservati in un vaso di vetro previamente sterilizzato, e si lascia la gelatina esposta all'aria per un certo numero di ore, che può variare da 4-5 fino a 24 ore; si turano quindi nuovamente i vasi e si portano in una stufa ad una temperatura di 20-22° C. Dopo un giorno si vede la gelatina coprirsi di colonie di microrganismi, che hanno l'aspetto ora di goccioline ed ora invece di punticini opachi e rotondeggianti. Al secondo giorno lo sviluppo delle colonie ha diggià progredito abbastanza, per poterle contare con una lente o al microscopio con deboli ingrandimenti. Più tardi non si può più, perchè le colonie crescendo si confondono fra di loro.

Ciascuna di queste colonie è una cultura isolata di microbi, colla quale si possono fare preparati microscopici da osservare coi forti ingrandimenti e farne altre culture a parte. Basta prendere per ciò coll'ago di platino sterilizzato una piccola porzione di ciascuna colonia ed innestarla in altrettanti tubi con gelatina, per avere di ciascuna una cultura netta, che si può conservare ed utilizzare per istudiarne le proprietà morfologiche e fisiologiche.

La gelatina con infuso di carne è uno dei mezzi di nutrizione più adatti per la ricerca dei germi dell'aria, poichè offre condizioni favorevoli allo sviluppo delle varie specie che vi sono contenute. Ma oltre di questa si possono preparare molte altre specie di gelatina nutritiva, sia coll'infuso di fieno, sia coll'infuso di frumento o con quello di frutta cotte, il quale ultimo è specialmente adatto per lo sviluppo dei germi delle muffe. Il mezzo forse il più conveniente di tutti per queste ricerche, nel quale si sviluppa uniformemente qualunque specie di microrganismi, è la gelatina con infuso di frumento. Ad ogni modo però, perchè l'esame riesca più completo che si può, è da consigliarsi di usare contemporaneamente tanto le patate cotte e dimezzate, come le varie specie di gelatina, preparata, come si è detto, in altrettanti cilindri di vetro. Nel caso speciale di ricerche dell'aria contenuta in camere di ammalati, nella quale si mira specialmente a scoprire l'esistenza di microrganismi patogeni, è da raccomandarsi sopra-

tutto la gelatina preparata coll'infuso di carne e siero sanguigno, mescolati insieme. Si può anche per le ricerche ordinarie, più grossolane, distendere semplicemente la gelatina su grandi lastre di vetro, le quali si lasciano per un certo tempo esposte all'aria e si collocano quindi sui banchetti di vetro entro le campane, mantenute umide colla carta da filtro bagnata e poste, come al solito, in una stufa a 20-22° C. Oppure si riempie colla gelatina un certo numero di scatole di vetro massiccie, quadrangolari e munite di coperchio, le quali si lasciano per vario tempo esposte all'aria e quindi si coprono e si mantengono alla temperatura di 20-22° C.

Non bisogna lasciare troppo tempo esposti all'aria i recipienti colla gelatina, altrimenti il numero dei germi che vi si depositano diviene così grande, che non si possono più contare; in media è sufficiente un'esposizione di 4-6 ore, e se l'aria è molto ricca di germi, anche un tempo minore.

Con tutti questi processi però non si era ancora riusciti ad enumerare con sufficiente esattezza i germi che sono contenuti in un determinato volume di aria, il che costituisce una delle cose più direttamente interessanti per l'igiene in siffatte ricerche. Recentemente il D.re Hesse (1) nel laboratorio del Koch è giunto a risolvere il problema col dare alla gelatina nutritiva una disposizione tale, da permettere che una quantità determinata di aria atmosferica, strisciando lentamente sulla superficie della stessa, vi depositi tutti quanti i germi che contiene; e questo lo ha ottenuto facendo passare l'aria attraverso lunghi tubi di vetro, le pareti interne dei quali sono rivestite di uno strato di gelatina.

Egli si è servito perciò di uno speciale apparecchio, che si trova disegnato nella figura 14 e consta essenzialmente di due parti: *a*) del tubo di vetro contenente la gelatina, sostenuto da

(1) Hesse, *Ueber quantitative Bestimmung der in der Luft enthaltenen Mikroorganismen*, Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. II, 1884, p. 182.

un alto treppiedi simile a quello usato dai fotografi; *b*) dell'aspiratore. Il tubo di vetro (*A*), lungo 70 cm. circa e largo 3,5 cm., di una capacità quindi di 670 ccm. circa, è chiuso ad una delle sue estremità con due calotte di gomma elastica, una più interna

Fig. 14 — Apparecchio di Hesse.

avente nel centro un foro del diametro di 1 cm. ed un'altra esterna, soprapposta alla prima e senza alcun foro. Per cominciare le ricerche si toglie, come è naturale, la calotta esterna, per lasciare libero ingresso all'aria attraverso il foro dell'altra calotta; si può anche porre una sola calotta e praticarvi un foro nel mezzo, o colle forbici o con uno strumento arroventato, un momento prima d'iniziare la ricerca. L'altro estremo del tubo è chiuso da un tappo di gomma, che ha nel mezzo un foro largo 1 cm., destinato a ricevere un piccolo tubo di vetro lungo 10 cm. circa e largo 1 cm.

Questo tubo ha nel suo interno due turaccioli di cotone, uno dei quali è situato all' estremità che sta dentro il tappo di gomma e sporge alquanto entro il lume del tubo maggiore. Questi turaccioli di cotone servono da filtro per l'aria che è stata aspirata attraverso il cilindro.

L'apparecchio di aspirazione, posto in comunicazione pel mezzo di un tubo di gomma col cilindro principale, consta di due bottiglie coniche della capacità di un litro, che stanno appese al treppiede con appositi uncini e sono in comunicazione fra di loro per mezzo d'un altro tubo di gomma, che porta nel mezzo una pinza a pressione. Quando si è riempita di acqua la bottiglia superiore e si apre la pinza a pressione, l'apparecchio funziona come un sifone, e viene quindi aspirata aria dal tubo che contiene la gelatina nella bottiglia superiore stessa, che si svuota a poco a poco. Quando questa è vuotata completamente, non si ha che cambiare posizione alle due bottiglie, mettendo sopra quella piena e adattandovi il tubo di gomma che parte dal cilindro, per aspirare di nuovo l'aria da questo. Un tale scambio si può ripetere tante volte per quanto è necessario. Bisogna evitare accuratamente qualsiasi aspirazione rapida e subitanea, come accadrebbe se entrasse aria nel tubo di gomma che pone in comunicazione le due bottiglie; per cui bisogna badare a chiuderlo colla pinza, prima che la bottiglia superiore sia svuotata completamente, e badare anche a che non vi sia aria nel tubo stesso prima di cominciare l'operazione.

L'altezza del dislivello fra le due bottiglie, nell'apparecchio adoperato dal D.re Hesse, oscilla fra 0,75-0,50 m. secondo l'altezza dell'acqua nelle bottiglie stesse. Per regolare il deflusso dell'acqua dall'aspiratore si adoperano tubi di vetro di vario calibro, che si introducono nel tubo di gomma da cui l'acqua fluisce, dopo di avere precedentemente determinato il tempo necessario a che un litro di acqua passi attraverso a ciascuno di quelli.

Il cilindro di vetro che deve contenere la gelatina si sterilizza anzitutto come di solito e quindi, dopo averlo chiuso da una delle sue estremità colle calotte di gomma, vi si versano dentro 50 ccm. di gelatina nutritiva liquefatta, composta in ge-

nerale con infuso di carne contenente il 5 % di gelatina. Si chiude l'altro estremo del cilindro col tappo di gomma, e si sterilizza nuovamente tutto insieme nella corrente di vapore acqueo a 100° C. per due ore.

Quanto alla disposizione più conveniente da darsi alla gelatina nell' interno del cilindro, il D.re Hesse ha sempre osservato nelle sue ricerche che i germi dell'aria, che si fa passare attraverso di quello situato orizzontalmente, si depositano tutti lungo il quarto inferiore della sua circonferenza. Parrebbe adunque a prima giunta conveniente di porre il tubo, subito dopo tolto dall'apparecchio di sterilizzazione, nella posizione orizzontale, perchè la gelatina solidificandosi si disponga sul quarto inferiore della superficie interna del tubo stesso. In tal caso però sulla parte superiore si condensa il vapore acqueo, il quale scola poi sulla superficie della gelatina, confondendo e guastando le colonie che vi si sviluppano: cosicchè, per ovviare a tale inconveniente, è preferibile di far solidificare la gelatina in modo che, pur ricoprendo di uno strato sottile tutta quanta la superficie interna del cilindro, si raccolga nella parte inferiore di questo in istrato più spesso. Per ottenere ciò, dopo avere estratto il tubo contenente la gelatina dall'apparecchio sterilizzatore e dopo averlo lasciato raffreddare alquanto, si pone sotto un getto di acqua fredda, imprimendogli di continuo un movimento di va e vieni nel senso orizzontale e girandolo attorno all'asse longitudinale, fino a che la massa gelatinosa è giunta a consistenza quasi solida. A questo punto si porta fuori del getto d'acqua e si continuano solamente i movimenti orizzontali, in guisa che la gelatina si depositi in maggior copia nella parte inferiore del tubo, ma che anche tutto il resto della circonferenza di questo rimanga coperto da uno strato sottile dello stesso materiale.

Una volta con una cinghia fissato il cilindro sopra il treppiedi e posto quello in comunicazione coll' aspiratore, non si ha che togliere colle dita bagnate nella soluzione di sublimato la calotta di gomma esterna, ed aprire la pinza a pressione che chiude il tubo di gomma per cui defluisce l'acqua dalla bottiglia superiore,

e la ricerca incomincia. Per evitare che, se vi sono correnti di aria, queste portino dentro al tubo germi staccati dalla persona di chi fa le osservazioni, l'apertura del tubo stesso dovrà essere diretta contro la corrente e l'osservatore stare dietro l'apparecchio. La quantità determinata di aria, che si aspira attraverso il tubo orizzontale e striscia sulla gelatina, deposita sulla superficie di questa tutti i germi che contiene; e se qualcuno ancor ne rimane, viene depositato sul piumacciolo di cotone imbevuto di gelatina, che chiude il tubo alla sua estremità, e attraverso il quale deve passare l'aria per andare nell'aspiratore. Se nessuna colonia di microrganismi si sviluppa in questo piumacciolo, ciò serve di controllo per stabilire che tutti quanti i germi dell'aria sono stati depositati nel tubo.

Quando la ricerca è terminata, si riapplica di nuovo la calotta di gomma, immersa prima nella soluzione di sublimato, si lascia stare fermo il cilindro per qualche minuto e si pone quindi nella medesima posizione in una stufa a 20-22° C.

Questo apparecchio, come si vede, è semplice e pratico ad un tempo, e il D.re Hesse in una serie numerosa di ricerche ha cercato di stabilire quali sono le disposizioni da darsi alle varie parti dello stesso, perchè le osservazioni riescano più esatte che si può. Ha studiato perciò l'influenza che esercita la velocità della corrente d'aria e la larghezza del foro d'ingresso, necessaria ad ottenere una data velocità, riuscendo a determinare certe particolarità del metodo che sono indispensabili a conoscersi, per ottenere risultati esatti e paragonabili fra di loro, e che sarà bene esporre in dettaglio, giacchè le ricerche dell'aria sono ancora da farsi in massima parte e promettono di riuscire della più alta importanza per l'igiene.

La condizione essenziale, a cui deve soddisfare la disposizione delle varie parti dell'apparecchio, è appunto quella che *tutti e quanti i germi, contenuti in una determinata quantità d'aria, sieno depositati sulla superficie della gelatina, divisi gli uni dagli altri*, in modo che si possano contare, osservare nelle loro particolarità di sviluppo e trasportare quindi singolarmente in

altrettanti tubi con gelatina, per istudiarne le proprietà biologiche principali. Per raggiungere questo scopo,

1° L'apertura praticata nella calotta interna di gomma, da cui deve entrare l'aria, non dev'essere troppo larga da far sì che la maggior parte dei germi si accumulino al principio del tubo, stante la piccola velocità dell'aria che entra, e neppure eccessivamente stretta, in modo che la velocità dell'aria sia poi troppo intensa ed una parte dei germi si depositi anche sui contorni dell'apertura stessa. Per tubi lunghi 70 cm. la larghezza più conveniente dell'apertura d'ingresso dell'aria è di 1 cm.; in generale però dev'essere uguale a quella del tubo di uscita.

2° La velocità dell'aria aspirata nel tubo dev'essere diversa a seconda del contenuto in germi dell'aria stessa. Nelle ricerche fatte all'aperto, perchè tutti i germi sieno depositati sulla gelatina, basta far passare attraverso il tubo 1 litro d'aria ogni 2-3 minuti, ed in quelle fatte in ispazi abitati, 1 litro ogni 3-4 minuti. Possono fare eccezione a questa regola soltanto i casi in cui l'aria sia eccessivamente carica di germi; ed allora è necessario fare alcune ricerche di prova, per determinare le singole condizioni favorevoli alla riuscita dell'osservazione.

3° La quantità d'aria totale, che dev'essere aspirata in ciascuna ricerca, varia secondo il numero dei germi che vi sono contenuti. Dalle ricerche di Hesse risulta che all'aperto anche 100 litri d'aria non sono troppi, mentre nei luoghi chiusi e con molta polvere anche un mezzo litro può essere di troppo, poichè può depositare un numero tale di germi, da essere poi impossibile contarli. Nelle condizioni ordinarie per le ricerche all'aria libera bastano 10-20 litri, e per quelle in luoghi chiusi 1-5 litri.

Applicando le norme ora esposte, si possono ottenere risultati abbastanza esatti e pieni d'interesse.

In primo luogo si vede che i germi vengono tutti depositati sulla parte inferiore del tubo, per cui non sono così leggieri come una volta si credeva, ed il numero delle colonie va a mano a mano diminuendo, a misura che sono situate più lontane dall'aper-

tura d'ingresso; cosicchè la disposizione delle stesse assume la forma di un triangolo allungato, di cui la base corrisponde all'apertura del tubo e l'apice è rivolto verso l'aspiratore.

Lo sviluppo delle singole colonie comincia ad essere visibile ad occhio nudo da 1-3 giorni dopo eseguita l'operazione, secondo il grado di temperatura dell'ambiente in cui i tubi si conservano. Nell'estate basta la temperatura della camera, nell'inverno si tengono nei termostati. La durata dell'osservazione dev'essere più lunga che si può, prolungata cioè fino a che si vede che alcune colonie, sviluppandosi rapidamente o fluidificando la gelatina, si vanno a confondere colle altre vicine. In generale però dopo 8-12 giorni tutti i germi capaci di svilupparsi sono cresciuti in altrettante colonie. È importante il fatto, osservato costantemente, che ogni colonia è una cultura isolata; il che dimostra che nell'aria non vi sono ammassi di germi riuniti insieme e neppure esistono elementi portatori dei germi stessi.

Per fare l'osservazione microscopica delle singole colonie si toglie la calotta di gomma, con un ago di platino sterilizzato se ne prende di ciascuna una piccola quantità e si distende su di un vetrino per colorirla. Si può anche egualmente farne innesti in tubi con gelatina, per istudiare le proprietà biologiche dei microrganismi. Le colonie crescono sulla gelatina con *forma, colore* e *contorni* diversi per ciascuna specie; per lo più appaiono sotto forma di macchie rotonde bianco-grigiastre o bianco-giallastre, oppure come piccole goccie, alcune delle quali sviluppandosi fluidificano la gelatina circostante ed altre no. Tutte queste particolarità devono essere attentamente studiate e raccolte da chi fa simili osservazioni.

Il D.re Hesse ed il Koch hanno eseguito un gran numero di ricerche nell'aria di Berlino, tanto all'aperto come nei vari luoghi d'abitazione nelle condizioni più svariate, ottenendone risultati molto interessanti.

Nell'aria libera di Berlino, a tempo secco, sono contenuti in media per ogni 2 litri d'aria un germe di funghi ed uno di batteri. Nell'aria di Londra invece havvi cinque volte tanto di germi che in quella di Berlino.

Queste ricerche hanno pure dimostrato ch'esiste una differenza grandissima nel contenuto di germi dell'aria, a seconda che questa è tranquilla

oppure è in movimento, ed a seconda che è ricca o povera di polvere. Nelle camere ove si sceglievano stracci, le colonie nei tubi colla gelatina erano in quantità innumerevole. Il numero e la qualità dei germi dell'aria sono anche in rapporto colla quantità assoluta d'umidità che questa contiene: infatti, quando il tempo era umido, nell'aria di Berlino si trovava un numero di germi molto minore e prevalentemente composto da funghi.

L'esame dell'aria contenuta nei luoghi di abitazione, in confronto con quello dell'aria aperta nella stessa località, dimostra differenze assai notevoli tanto nel numero dei germi, che è nel primo caso assai maggiore, come nella qualità degli stessi, giacchè l'aumento è specialmente a carico dei così detti « batteri ». Bisogna aggiungere però che tali differenze appaiono solamente allorquando le persone abitanti si muovono, o quando l'aria è posta in movimento per un'altra causa qualunque; giacchè se è tranquilla, l'aria nelle abitazioni può perfino contenere un numero minore di germi dell'aria libera. Invece il contenuto di acido carbonico non ha nessun rapporto col numero di quelli; infatti può l'aria essere povera di CO^2 e ricchissima di microbi, o viceversa. Questo fatto dimostra come sieno insufficienti le ricerche dirette a determinare la salubrità dell'aria di certi luoghi, basate soltanto sull'esame del contenuto di CO^2.

Le camere rinchiuse e disabitate sono quasi prive di germi, e la polvere che da molto tempo si è depositata sui mobili di camere antiche ne è povera altrettanto.

Molto istruttive sono le ricerche fatte dal D.re Hesse sull'aria di una scuola di ragazzi prima, durante e dopo la lezione. In due litri d'aria, esaminata prima dell'entrata degli scolari, si contenevano soltanto 6 germi di microbi; nella stessa quantità d'aria, esaminata durante la lezione, se né trovarono 40; e finalmente durante l'uscita dei ragazzi il numero dei germi contenuto in due litri d'aria si elevò ad 80.

Dai pochi esempi finora citati si vede quale e quanta differenza esista a riguardo del contenuto in germi dell'aria anche nella stessa città, ma in luoghi diversi e in diverse condizioni, differenza poi che è altrettanto notevole per le singole città.

Dalle ricerche, fatte da Hesse sull'*aria del terreno*, risulta che da un terreno umido e discretamente compatto non fuorescono germi insieme coll'aria; sicchè si può dire che, se anche alcuno di questi può essere talora portato dal terreno nell'aria, ciò può accadere soltanto quando si tratta di una terra secca e non compatta, ed anche in tal caso i germi non possono provenire che da una piccola profondità. Invece l'aria fuoruscente da un cumulo di letame ne conteneva un numero discreto.

È stata anche sperimentata la permeabilità pei germi dei varii materiali da costruzione, pietra arenaria, mattoni e calcistruzzo; ed è risultato che strati discretamente sottili dei materiali più porosi non lasciano mai passare i germi dei batteri, mentre passano talora quelli delle muffe. Questo fatto, unito all'altro che nella gelatina contenuta nei tubi dell'apparecchio di Hesse i germi dei batteri si depositano più vicino degli altri all'apertura d'ingresso dell'aria, fa supporre che gli stessi esistono in questa non già isolati, ma aderenti al pulviscolo o riuniti in ammassi, e sono perciò più pesanti.

Finalmente il contenuto di germi dell'aria atmosferica varia anche notevolmente colle stagioni, e nell'inverno l'aria è più povera di microbi che nella state e nell'autunno; altrettanto accade degli strati superiori dell'atmosfera in confronto di quelli più bassi, i quali contengono un numero di germi sempre maggiore. In generale finchè dura l'accrescimento delle piante sono più numerosi i funghi ed i saccaromiceti; al contrario i cosidetti batteri si trovano specialmente nell'aria nell'inverno e nell'estate. Credo utile di riprodurre qui un piccolo specchio sinottico dei risultati principali ottenuti dal D.re Hesse con 200 osservazioni.

DATA	STATO dell' ATMOSFERA	LOCALITÀ	Quantità d'aria aspirata	Tempo di passaggio di 1 litro d'aria	COLONIE			OSSERVAZIONI
					Batteri	Funghi	Quantità totale	
1882			minuti	minuti				
8 febbraio	Pioggia fina	Berlino (all'aperto)	95	2,5	3	16	19	
23 gennaio	Neve	—	73,75	2,3	10	9	19	
28 gennaio	—	—	20	1	7	4	11	
31 gennaio	—	—	20	1	3	8	11	
13 febbraio	—	—	50	2	7	22	29	
8 febbraio		Berlino (camera d'abitazione)	6,5	5	41	1	42	
25 novembre		Schwarzenberg (camera)	10	4	15	11	26	Nell'atto di togliere la polvere dai mobili
25 febbraio		Berlino (camera della scuola)	2	4	3	1	4	Prima della lezione
—		—	2	4	19	14	33	Durante la lezione
—		—	2	4	37	33	70	Durante l'uscita degli scolari
3 ottobre	Pioggia	Schwarzenberg (all'aperto)	12	3	18	8	26	Vento
18 ottobre		—	12	3	7	9	16	

Per quanto questo metodo di ricerca dei microrganismi dell'aria sia di gran lunga superiore a tutti quelli usati finora, non si può dire perciò che sia perfetto e che le cifre che se ne ottengono abbiano un valore assoluto. Esistono anche qui alcune cause d'errore, e di queste la principale si è che non tutte le specie di germi trovano nella gelatina il terreno adatto pel loro sviluppo; riesce anzi difficile di potere scoprire in tal modo la presenza de' microrganismi patogeni nell'aria, cosa che per l'igiene sarebbe d'importanza capitale. Difatti questi ultimi hanno

bisogno in generale per svilupparsi di un grado di temperatura piuttosto elevato, e non hanno uno sviluppo così rapido come lo hanno, ad esempio, i germi delle muffe e di altri microbi, le colonie dei quali, estendendosi rapidamente, impediscono lo sviluppo di quelle vicine. Così la ricerca dei bacilli tubercolari nell'aria con tal metodo sarebbe impossibile, poichè quando sono trascorse due settimane, quanto è il tempo necessario allo sviluppo degli stessi, le colonie sviluppantesi dagli altri germi hanno già coperto ogni cosa. Anche con questo metodo adunque si determina soltanto la quantità *relativa* e non la quantità assoluta dei germi contenuti in un dato volume di aria.

Ad ogni modo però coll'apparecchio di Hesse la tecnica di questi studi ha fatto un progresso molto notevole, sia rendendo possibile l'enumerazione abbastanza esatta dei germi e il paragone dell'aria di località diverse, come anche aprendo la strada ad ulteriori miglioramenti. Le ricerche dell'aria fatte in tal modo nei luoghi ove dominano epidemie, nei luoghi di malaria, sui laghi, nei deserti e così via, offrono un campo di studio tuttora inesplorato ed interessantissimo per la soluzione di molti quesiti, appartenenti all'igiene delle malattie da infezione.

Ricerca dei microrganismi nell'acqua.

Come per l'aria anche per l'acqua la teoria dei contagi viventi ha portato una completa rivoluzione nei metodi di ricerca, relativi all'esame delle proprietà igieniche della stessa. Per stabilire se una determinata qualità di acqua è igienica o no, le analisi chimiche debbono sempre venire in seconda linea alle ricerche microscopiche ed alla determinazione della quantità e qualità dei germi che contiene. Difatti un'acqua può essere chimicamente pura, come è l'acqua distillata dei nostri laboratorî, e contenere tuttavia un certo numero di microbi; e viceversa un'altra acqua, chimicamente impura, può contenere pochi microrganismi.

Per fare quest'esame bisogna anzitutto raccogliere l'acqua che si vuole esaminare, in modo da escludere qualsiasi possibilità di un' aggiunta accidentale di germi estranei a quelli che già contiene. A tale uopo si sterilizzano nella maniera ordinaria alcuni recipienti di vetro, provvisti del turacciolo di ovatta, ed in questi si raccoglie l'acqua direttamente, avendo l'avvertenza, se viene da una conduttura metallica, di lasciarla scorrere per qualche minuto prima di raccoglierla. Se si deve trasportare da un luogo ad un altro, si usano piccole bottiglie di vetro con tappo smerigliato, sterilizzate, coperte con un cappuccio di gomma elastica, parimenti sterilizzato, e racchiuse in una cassetta di legno. Quando poi deve passare un certo tempo fra il momento in cui l'acqua si è raccolta e quello della ricerca, è necessario mantenerla a bassa temperatura, perchè un grado di calore un po' elevato fa aumentare il numero dei germi ed altera così i risultati delle ricerche da farsi sulla quantità degli stessi.

Il primo esame che si deve fare in ogni caso è quello microscopico, e si eseguisce semplicemente ponendo una piccola goccia di acqua in un portoggetti lavato coll' alcool, ricoprendola con un coproggetti e facendone così l' osservazione immediata. Fatto questo, si lascia disseccare lo strato di liquido sui due vetrini, si colora coi soliti mezzi e si osserva di nuovo.

Volendo però determinare il numero dei germi capaci di svilupparsi e volendo cercare se fra quelli avvene alcuno dotato di proprietà patogeniche, è necessario fare le culture.

Per l'acqua non si può, come per l'aria, lasciar depositare i microbi sulla superficie della gelatina; bisogna invece mescolarla con questa in tali proporzioni, che i singoli germi *si sviluppino isolati gli uni dagli altri e si possano così osservare direttamente al microscopio, contarli ed ottenerli quindi separati in altrettante culture, per poterne osservare le proprietà biologiche principali.*

Con una pipetta previamente sterilizzata, lavata ripetutamente nell'acqua da esaminare, si prende di questa una piccola quantità determinata, variabile a seconda del contenuto maggiore

o minore di germi, e si mescola accuratamente con 10 ccm. di gelatina liquefatta; si distende la gelatina sopra una lastra di vetro sterilizzata, e si pone in una campana umida ad una temperatura di 16-20° C. Siccome quest'operazione si compie in contatto dell'aria, dalla quale possono cadere germi sulla gelatina, così si usa tenere due o tre lastre di vetro di controllo, sulle quali si distende la stessa quantità di gelatina, mescolata con una piccola quantità di acqua distillata e sterilizzata. Se il numero delle colonie sviluppatesi non è grande, si possono contare senz'altro con un microscopio semplice ad un ingrandimento di 30-40 diam.; ma se sono numerose, si pone la lastra colla gelatina sopra una rete divisa in centimetri quadrati, si conta la quantità di colonie contenuta in un certo numero di divisioni, se ne deduce la media e questa si moltiplica per l'estensione totale della superficie della gelatina.

Le cifre che se ne ottengono non sono assolutamente esatte, giacchè non tutti i germi si sviluppano nelle condizioni anzidette di nutrizione e di temperatura, ed inoltre qualche colonia può benissimo svilupparsi anzichè da uno, da due o più germi riuniti insieme. Le cifre ottenute con questo metodo sono sempre adunque un po' inferiori alla verità; sono sufficienti però per poter fare confronti, ed a tale oggetto si deve anzi in ogni caso fare il calcolo per la stessa quantità d'acqua, ad es., per un centimetro cubico. Se poi l'acqua è molto ricca di germi, se ne diluisce 1 ccm. con 10, 20, 30, 100 ed anche 1000 ccm. d'acqua sterilizzata, in modo da ottenere sulla gelatina lo sviluppo isolato dei singoli microrganismi.

Questo metodo serve benissimo per controllare il valore igienico dei filtri. A questo proposito sono state eseguite dal professore Rozsahegyi, nel laboratorio del Koch, un gran numero di ricerche su tutte le specie di filtri che si usano comunemente, e ne è risultato che la maggior parte di quelli non trattiene quasi nessun germe e gli altri ne trattengono così pochi, che non si può dire assolutamente che servono a purificare l'acqua che vi passa attraverso. Io stesso ho avuto occasione di provare il filtro del Chamberland di Parigi, ed ho trovato che i due terzi almeno della quantità totale dei microbi contenuti nell'acqua passa liberamente attraverso al filtro. Il Koch fa giustamente osservare che talora i filtri possono servire a con-

taminare l'acqua, anzichè a purificarla; difatti il filtro trattiene le impurità più grossolane e queste, accumulandosi a poco a poco sul filtro stesso, si decompongono ed aggiungono allora microrganismi all'acqua che vi passa.

Allorchè le colonie sono state enumerate, si possono coltivare separatamente, come già si è detto, per provarne le proprietà fisiologiche, quando si creda necessario. — Quello che è stato ora esposto, per la ricerca dei microrganismi nell'acqua, vale ugualmente per qualsiasi altra specie di liquido che si vuole esaminare. Se si tratta, ad es., di fare ricerche nel latte o nelle materie fecali, non si ha che mescolare questi liquidi colla gelatina in proporzioni tali che, distendendola sulle lastre di vetro sterilizzate, i singoli germi si sviluppino separatamente gli uni dagli altri.

Ricerca dei microbi nel terreno.

È questa una delle ricerche che ha un valore maggiore per lo studio del ciclo vitale dei microparassiti al difuori dell'organismo che li alberga. Di molte malattie sono ormai conosciuti indubbiamente gli elementi patogenici, ma quale sia il destino ulteriore di questi fuori dell'organismo, se gli stessi, cioè, trovino nel terreno, dove vanno a finire le sostanze di rigetto del corpo animale, condizioni favorevoli alla loro riproduzione e conservazione, questo è un fatto che si suppone ragionevolmente, ma che non si è potuto ancora dimostrare in maniera positiva.

Già Schlösing e Münz (1), ed anche altri dopo di loro, avevano dimostrato che la decomposizione di certe sostanze organiche nel terreno avviene per opera di microbi speciali; ma spetta al Koch (2) il merito di avere trovato per primo nel terreno germi di microrganismi patogeni e precisamente quelli del cosidetto *edema maligno*. In seguito il Nicolaier (3) ha colti-

---

(1) Schlösing e Münz, Comptes-rendus. Vol. 78, p. 203 e 353; vol. 84, p. 301, e vol. 89, p. 891.

(2) Koch, Mitth. a. d. kais. Ges., Bd. I, 5, 56, 1881.

(3) Nicolaier, *Ueber infectiösen Tetanus*. Deutsche med. Wochenschr. 1884, No. 52.

vato dal terreno una specie di bacilli, i quali inoculati nei conigli, nelle cavie e nei topi bianchi producono una forma tetanica trasmissibile direttamente ad altri animali.

Avvi in Germania una scuola, capitanata dal Pettenkofer, la quale ha voluto generalizzare l'influenza del terreno per lo sviluppo di tutte le malattie infettive, che si svolgono in maniera epidemica: non esistono però finora prove dirette di fatto in appoggio di questa dottrina.

Questa ricerca non differisce essenzialmente da quella dell'acqua. Si può fare in due modi: o si mescola una piccola quantità di terreno, finamente polverizzato in un mortaio pulito colle solite cautele, con una certa quantita di gelatina, che si distende sulle lastre di vetro; oppure si distende prima la gelatina, e quando questa sia raffreddata fino a consistenza pastosa, vi si sparge sopra la polvere del terreno colla punta di una spatola sterilizzata, come si fa del sale sulle vivande. Siccome tutte queste operazioni si fanno naturalmente in contatto dell' aria e da questa può cadere qualche germe sulle culture, si usa preparare contemporaneamente altre lastre di vetro con gelatina, a cui si mescolano particelle dello stesso terreno, rese sterili a 150-160° C. Il numero e la qualità di germi, che si sviluppano su queste culture di controllo, indicano la misura dell'errore dovuto alle impurità accidentali cadute dall'aria; per quanto però sia già un criterio sufficiente, per riconoscere le colonie sviluppantesi dai germi del terreno da quelle provenienti dall'aria, il fatto che le prime hanno sempre il loro punto di partenza da un granello di terra.

Un'altra avvertenza da aversi è quella di coprire una o due lastre di vetro, preparate colla polvere del terreno, con una lamina di mica sterilizzata; e questo nello intento di favorire lo sviluppo di certe varietà di microrganismi, che sono « anaerobi » e che sono stati già rinvenuti nel terreno (bacilli dell'edema maligno e quelli della fermentazione butirrica). Dalle colonie che si sviluppano così attorno a ciascuna particella di terra si possono poi ottenere culture separate e studiarle, come si è detto pei germi

dell'acqua. Qui è da fare attenzione specialmente alle forme che sporificano, giacchè con ogni probabilità le specie patogeniche si conservano nel terreno sotto forma di spore. Si deve anche tentare l'innesto diretto del terreno negli animali, giacchè è un mezzo eccellente per ottenere talora in cultura isolata certi microrganismi, i quali possono anche non svilupparsi sulla gelatina in condizioni ordinarie. È questo anzi il mezzo con cui è stato coltivato dalla terra dei giardini il bacillo dell'edema maligno.

Le poche ricerche istituite finora dal Koch sui microbi del terreno hanno dato diggià risultati degni di menzione. In generale gli strati di terreno superficiali, presi di fresco, sono assai ricchi di germi, specialmente di bacilli e contengono invece pochi micrococci. Se si lasciano disseccare per alcune settimane gli stessi saggi di terreno, facendone quindi le culture, non si sviluppa più alcun micrococco, ma si sviluppano invece tutti bacilli ed in quantità quasi eguale che nello stato fresco. Questo fatto è assai dimostrativo, poichè essendo noto che i microrganismi nello stadio ordinario di vegetazione, se si disseccano, non si mantengono in vita lungo tempo, ciò indica che i micrococci muoiono per opera del disseccamento e che i bacilli si trovano nel terreno sotto forma di spore. Una siffatta deduzione è pure confermata dal fatto che i germi bacillari del terreno resistono a gradi di temperatura molto elevati, ai quali possono resistere solamente le spore.

Un altro fatto notevole, pure osservato dal Koch, è che la quantità dei germi nel terreno diminuisce rapidamente coll'aumentare della profondità, tanto che un metro al disotto del livello del terreno non si trova più alcuna specie di bacilli e soltanto qualche piccolo micrococco isolato. Questo fatto contraddice apertamente all'opinione di Nägeli, il quale crede che gli strati profondi del terreno, a livello dell'acqua del sottosuolo, sieno un vivaio abbondante di microrganismi. Il Koch ha fatto anche ricerche sul terreno profondo in vicinanza di un corso d'acqua di Berlino, assai impuro e ricco di microbi, ed ha trovato ugualmente che i saggi tolti da due piedi di profondità non contenevano che pochissimi germi, ed a tre piedi il terreno ne era privo quasi completamente.

Si vede adunque che, estendendo queste ricerche, fatte con metodi sicuri e positivi, dovranno essere radicalmente modificate, come si è già fatto per l'aria e per l'acqua, le idee che hanno dominato finora sull'importanza igienica dell'impurità del terreno prodotta dalla presenza di microbi.

Intanto, se si vuole da quanto è stato esposto sulla ricerca dei germi nell'aria, nell'acqua e nel terreno dedurre l'importanza pratica dei risultati di tali studi, dobbiamo dire anzitutto che si

13

deve evitare in ciò qualsiasi esagerazione, e non dichiarare subito nociva alla salute un' aria, un' acqua od un terreno in cui si sono trovati germi di microrganismi. Finora fra le moltissime specie di microbi trovati in questi mezzi, due o tre solamente, appartenenti al terreno, hanno dimostrato proprietà patogeniche; cosicchè si può ammettere con ragione che, in tutto quel numero di microrganismi, pochissimi soltanto se ne trovino nocivi alla salute. D'altra parte però, se, facendo l'analisi di un'acqua, vi si trova in copia ammoniaca, cloruri, nitrati ecc., e si giudica quindi insalubre, questo giudizio acquisterà un valore tanto maggiore, quando si trovino contemporaneamente in quell'acqua copiosi i microbi, per quanto nessuno di questi possegga proprietà patogeniche. Dobbiamo dire in fine che in questa parte di studi vi è ancora molto, direi anzi tutto da fare, e non è affatto impossibile che cercando attivamente si riesca a scoprire quello che finora non si è potuto dimostrare, vale a dire la presenza nell'aria, nell'acqua e nel terreno dei microparassiti specifici delle singole malattie da infezione.

CAPITOLO VI.

Sostanze di nutrizione e metodi di cultura.

Dopo che negli organi e nei tessuti degli animali ammalati è stata osservata una data specie di microrganismi, per dimostrare la natura parassitaria od infettiva della malattia, è necessario che i microbi caratteristici sieno capaci di riprodurre, inoculati negli animali sani, la stessa forma morbosa primitiva; e perchè questa dimostrazione abbia un valore sperimentale indiscutibile, il liquido che serve per lo innesto non deve contenere che una sola specie di microbi, quella, cioè, di cui si vuol provare l'azione patogenica, senza contenere neppure sostanze organiche provenienti dai tessuti ammalati e capaci di produrre fenomeni di intossicazione.

Per separare i microparassiti dai prodotti patologici si era prima ricorso alla *filtrazione*, ma questo mezzo di isolamento è inesatto, poichè insieme cogli elementi parassitari rimangono nel filtro anche gli elementi organizzati (corpuscoli del sangue e del pus, pezzi di tessuti ecc.), ed anche perchè i germi più fini passano attraverso qualsiasi filtro.

Soltanto le *coltivazioni artificiali* permettono di isolare completamente una data specie di microrganismi, giacchè facendoli riprodurre da una prima cultura, per parecchie generazioni e col mezzo di innesti successivi, in sostanze di nutrizione sempre nuove, si deve ottenere finalmente una *cultura netta*, nella quale non si trova più nessuna particella di quei tessuti o materiali, da cui fu tolta primitivamente la sostanza per l'innesto.

Ottenere isolata però una data forma di microrganismi dalle altre, colle quali quasi sempre si trovano commisti, è forse la parte più difficile di queste ricerche; e che sia così ce lo addimostrano gli sforzi fatti per raggiungere questo intento da tutti coloro i quali si sono occupati dell'argomento, venendo proposti per ciò metodi diversi, i quali oggidì sono stati sostituiti con vantaggio da quello più recente del Koch.

I metodi usati per lo addietro sono stati ormai riconosciuti, qual più qual meno, tutti insufficienti; per cui conservano ancora un valore storico molto notevole, ma non hanno più che un'importanza pratica assai limitata. Non credo adunque opportuno di esporli in dettaglio, e stimo invece sufficiente per lo studioso di farne un accenno, esponendo il concetto e la base di ciascuno di quelli, anche nello scopo di dimostrare come questo ultimo del Koch abbia riunito in sè, con una sintesi felicissima, tutti i vantaggi che venivano offerti singolarmente da ciascuno dei metodi precedenti.

Ottenere una data forma di microbi in cultura netta vuol dire *prendere un recipiente di vetro sterilizzato, chiuderlo con ovatta, egualmente disinfettata, in modo che non permetta il passaggio dei germi, mettervi dentro una sostanza nutritiva sterilizzata ed in questa innestare un materiale, contenente quella sola specie di microrganismi che si vuol coltivare.* Per ottenere adunque una cultura isolata sono necessarie le condizioni seguenti:

1° Il recipiente destinato a contenere le culture dev' essere sicuramente disinfettato.

2° Il substrato materiale deve avere una certa composizione chimica, appropriata allo sviluppo dei microbi che si vogliono coltivare, e non deve contenere neppure un germe estraneo.

3° L'ovatta dev' essere disinfettata e deve impedire l'ingresso di germi dal di fuori (cosa che non sempre si verifica specialmente pei germi delle muffe).

4° Il materiale da coltivare dev'essere puro, ossia non deve contenere che una sola specie di microbi. È questa la parte più difficile del quesito, per la quale appunto si è proposto un gran numero di processi.

5° Finalmente, sì nella prima cultura come nelle altre successive, dev'essere impedito durante le manipolazioni l'accesso alle impurità provenienti dall'aria atmosferica.

Se una qualsiasi di coteste condizioni non si verifica, non si possono ottenere le culture isolate. Vediamo ora in quale misura soddisfacevano alle stesse i metodi usati dai ricercatori prima del Koch.

Metodi di coltivazione coi liquidi.

A) — Metodo di Pasteur. — Il metodo di Pasteur, che usa i mezzi di nutrizione liquidi e trasparenti, è il più antico ed ha servito di base ai primi studi fatti sui processi di fermentazione. Il principio di questo metodo è abbastanza semplice, e consiste nel prendere una piccolissima quantità del materiale contenente i microbi da coltivare ed innestarlo in un liquido, la cui composizione si avvicini, per quanto è possibile, a quella del liquido nel quale primitivamente sono cresciuti i microbi. Quando questi si sviluppano, il liquido si intorbida; ed allora se ne prende di nuovo una piccola quantità e si innesta in un secondo saggio di liquido; e così di seguito, finchè si ottiene una cultura, *cosidetta pura*, di una specie di microrganismi.

Questi liquidi si tengono dal Pasteur in matracci di vetro speciali, a tubulatura doppia, una delle quali, chiusa con tappo di gomma, serve per introdurre il materiale di cultura e l'altra, lunga e ripiegata, serve a dar passaggio all'aria che si spoglia dei suoi germi lungo il decorso del tubo stesso.

Naturalmente, quando si pongono in un liquido nutritivo parecchie specie di microbi, si sviluppano a preferenza una o due forme soltanto, quelle cioè che si trovano in condizioni più favorevoli per la loro riproduzione. Si può allora, osservandone il prodotto al microscopio, credere di aver a che fare in realtà con una cultura netta, mentre invece a lato di quella specie che ha

preso il sopravvento esistono pure i germi delle altre, che non si sono potuti sviluppare, ma che rimangono in vita e possono benissimo crescere, quando sieno posti in altre condizioni più favorevoli. Oltre a ciò è quasi impossibile con un tal metodo di potere ottenere isolata una certa specie di microrganismi piuttosto che un'altra, specialmente se si tratta di forme parassitarie, le quali sono facilmente soperchiate, in quella specie di lotta per l'esistenza, dalle forme semplicemente saprofitiche. Questo è il motivo per cui nelle antiche ricerche sui microbi entrava per tanta parte il *bacterium termo* ed il *bacillus subtilis*, i germi dei quali, sparsi dappertutto, si sviluppano con estrema rapidità. Queste cause d'errore sono così grandi ed evidenti, che non mi sembra necessario spendere ancora altre parole per dimostrare la insufficienza del metodo stesso.

I liquidi di cultura proposti sono moltissimi. Secondo il Pasteur, per stabilire la composizione dei liquidi di nutrizione, si deve prendere sempre per punto di partenza quella del liquido ove si sono originariamente sviluppati i microbi; per cui, se questi si sono trovati nei substrati solidi, si useranno i *decotti* o gli *infusi* della stessa sostanza (fieno, frutta secche, grano, ecc.). Secondo il Brefeld poi, i liquidi che devono servire per la coltivazione dei funghi debbono avere una reazione debolmente acida, e quelli per la cultura dei cosidetti « batteri » devono essere neutralizzati o resi alcalini debolmente col carbonato di soda, e quindi cotti e filtrati.

I liquidi usati di preferenza dal Pasteur sono però l'urina ed il brodo di pollo, neutralizzati e sterilizzati. La sterilizzazione nel metodo anzidetto si compie col calore a 110° C., oppure, siccome il calore elevato affievolisce le proprietà nutritive dei liquidi organici, per mezzo della *filtrazione a freddo* con un apparecchio di filtrazione speciale, proposto dal Pasteur e dal Miquel (1). All'insufficienza di un tal processo di sterilizza-

(1) Miquel, Bulletin de la Société chimique de Paris, t. 35, p. 552.

zione si è già accennato a proposito della ricerca dei microrganismi nell' acqua e delle esperienze, fatte nel laboratorio del Koch coi vari filtri comunemente adoperati.

B) Il metodo cosidetto delle CULTURE FRAZIONATE, proposto dal Klebs (1), consiste nel prendere da un liquido, che contenga parecchie forme di microbi, una piccolissima quantità di materiale e portarlo in un'altra soluzione nutritiva sterilizzata (*a*), nello innestare da questa una seconda soluzione (*b*) e quindi una terza (*c*), una quarta (*d*) e così di seguito, finchè si riesce ad ottenere o l'una o l'altra delle primitive forme di microrganismi allo stato di purezza, sia nella cultura *a*, che in quella *b*, *c*, *d* ecc. Questo metodo non è che una complicazione, nient'affatto utile, di quello di Pasteur, giacchè ne ha del pari tutti gli svantaggi oltre l'inconveniente che bisogna affidarsi completamente al caso, il quale può dare isolata una piuttosto che un'altra specie di microbi, e precisamente quella specie che ha sviluppo più rapido delle altre, invece di quella che si desidera.

C) IL METODO DELLE DILUZIONI di Nägeli (2) e di Buchner presuppone già che quella certa forma di microrganismi, che si cerca di isolare, esista nel liquido primitivo in quantità prevalente, e consiste nel diluire progressivamente questo liquido con acqua sterilizzata, fino a che ogni goccia contenga un solo individuo di quella specie. Si pone allora una goccia dell'ultima diluzione in un gran numero di recipienti, contenenti le sostanze liquide di nutrizione, e si ottiene così in qualcuno di questi isolata la forma che si desidera. Per dare un esempio concreto, prodotto dal Nägeli stesso, si voglia da un'orina putrefatta, che contiene cocci e bacilli, ottenere isolati i primi soltanto. Si determina, coi metodi ordinari che servono pel conteggio dei corpuscoli sanguigni, il numero di microrganismi contenuto in una goccia di liquido, la quale rappresenta all'incirca il volume di

(1) KLEBS, Archiv für experimentelle Pathologie, Bd. 1, 1873, p. 31.
(2) NAEGELI, *Untersuchungen über niedere Pilze*, 1882.

0,03 ccm.: ve ne sieno ad es. 500,000; si diluisce questa goccia una prima volta con 30 ccm. di acqua distillata, si scuote fino ad ottenere una miscela omogenea e da questo liquido, già diluito 1000 volte, si prende una goccia, e si diluisce nuovamente in 30 ccm. di acqua sterilizzata. Si ottiene così una diluzione ad un millionesimo, la quale contiene in ogni due goccie (di 0,03 ccm. ciascuna) un individuo microbico. — Di 10 recipienti contenenti liquidi di nutrizione sterilizzati, in ciascuno dei quali si innesta una goccia dell'ultima diluzione, secondo il Nägeli, 4 rimangono sterili, in uno si sviluppano i bacilli ed in 5 i cocci che si desiderano.

Questo metodo, così lungo e noioso, non può riuscire esatto nelle sue applicazioni, sia perchè è quasi impossibile contare esattamente corpicciuoli così minuti come i microbi, sia anche perchè la miscela dei liquidi non riesce mai completamente uniforme, e durante le numerose manipolazioni che sono necessarie è assai facile la penetrazione di qualche impurità. Ha del resto in comune con tutti gli altri metodi suaccennati gli inconvenienti che offrono i mezzi liquidi di nutrizione.

Il Salomonsen (1) ha inoltre usato i tubi capillari per ottenere coltivati isolatamente i microrganismi della putrefazione del sangue; ma anche con questo metodo, se possono ottenersi isolate le colonie nei liquidi i quali, come il sangue, coagulano spontaneamente, non si ottiene più l'isolamento quando si usano vere soluzioni.

Questi diversi metodi hanno dato senza dubbio in mano di abili sperimentatori risultati generali attendibili, ma offrono molti inconvenienti; e il principale si è che le soluzioni nutritive non permettono di riconoscere la contaminazione con germi stranieri, avvenuta nel corso delle esperienze. Sonvi alcuni segni che indicano anche all'occhio nudo che è avvenuta una qualche alterazione, ma l'assenza dei segni stessi non prova per nulla il contrario, che cioè la cultura sia rimasta netta. E neanche l'esame microscopico è sufficiente a stabilire questo fatto, perchè la goccia che si esamina può non contenere gli organismi sospetti e questi possono avere una forma

---

(1) Salomonsen, *Zur Isolation differenter Bacterienformen*, Botanische Zeitung, 1876, No. 39 e 1880, No. 28.

simile a quelli di cui si vuole studiare l'azione patogenica. Aggiungi a ciò che l'osservazione microscopica ripetuta obbliga a manovre, che rendono quasi impossibile il mantenere nette le culture.

Se invece si riduce considerevolmente la massa del liquido nutritivo, in modo da poterlo osservare al microscopio in tutta la sua estensione, allora soltanto è possibile di constatare la presenza di germi estranei. Questo metodo consiste essenzialmente nel coltivare i microbi in *camere umide* e *chiuse*, che si pongono sul tavolo del microscopio, ed ha dato buoni risultati, specialmente per la coltivazione del *Bacillus anthracis* fatta dal Koch.

Anche questo però ha un'applicazione limitata ed è impraticabile per le specie più minute, le quali non si possono riconoscere che mercè una precedente preparazione per mezzo dei reattivi coloranti; molte volte poi non riesce in causa delle condizioni sfavorevoli di sviluppo, in cui sono posti in tal modo i microrganismi (aerobi).

Le coltivazioni nei liquidi adunque non sono già da abbandonarsi totalmente, e sono anzi necessarie per istudiare alcune proprietà biologiche importanti dei microrganismi; debbono però venire usate, almeno nello studio delle forme patogene, sempre in seconda linea, allorquando, cioè, si sia ottenuta isolata coi metodi perfezionati del Koch quella specie che si vuole studiare.

Un notevole progresso nella pratica della coltivazione dei microrganismi fu fatto per opera del Klebs e del Brefeld (1), i quali studiarono le varie fasi dello sviluppo di questi esseri direttamente al microscopio, e per impedire l'evaporazione del liquido e il movimento dei microbi, usarono per primi le sostanze solide e la gelatina. Il Brefeld cercò dapprima di ottenere col metodo delle diluzioni un materiale di cultura puro ed isolato, per *potere da un unico germe seguire tutto il ciclo dello sviluppo di ogni singola specie di microrganismi.* Questo metodo bensì, il quale teoricamente costituirebbe l'ideale dello studio della biologia dei microparassiti, non è applicabile in pratica che per pochissime specie, giacchè sono necessarie per lo più condizioni assai diverse di temperatura e di nutrizione, perchè si svolgano le singole fasi della vita di questi esseri (vegetazione, sporificazione, germinazione).

Un primo passo in avanti si era già fatto anche dallo Schröter (2), il quale avea usato per primo un substrato materiale solido, le patate, per ottenere la cultura netta dei microbi cromogeni; ma spetta al Koch il merito di avere riunito in un metodo unico i singoli vantaggi che offrivano quelli precedenti, ciascuno di per sè, colmandone le lacune e gettando le basi così del metodo più generale e più semplice nella sua applicazione.

---

(1) Brefeld, *Methoden zur Untersuchung der Pilze.* Verhandl. der physik. med. Gesellschaft in Würzburg, Bd. VIII, 1874-75, s. 43. — Lo stesso, *Kulturmethoden zur Untersuchung der Pilze,* Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. Bd. IV, 1881, s. 1.

(2) Schröter, *Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente,* Cohn's Beiträge, Bd. I, Heft 2, s. 109.

Metodo di cultura colle sostanze solide o metodo del Koch.

Il principio fondamentale di questo metodo, che ha una data tutt'affatto recente (1880), si riduce ad ottenere *che ciascuna colonia si sviluppi sicuramente da un germe isolato*. Per dimostrarne il valore serve un'esperienza semplicissima e ben conosciuta in micologia, alla quale si è già accennato parlando dell'esame micologico dell'aria; questa consiste nello esporre all'aria alcuni pezzi di patate, precedentemente bollite, e nell'osservare le diverse vegetazioni di muffe di cui si coprono da lì a qualche giorno. Allorchè le patate sono state sterilizzate, cotte, spaccate per metà ed esposte all'aria, e si pongono quindi entro una campana di vetro in un'atmosfera umida che ne impedisca il disseccamento, vi si vedono apparire dopo due o tre giorni piccole macchie puntiformi, gocciolette diverse l'una dall'altra, sia pel colorito, come per la forma e per la rapidità del loro sviluppo: quà e là poi, fra questi gruppi polimorfi e policromi, si veggono le vegetazioni a micelio delle muffe. Esaminandoli colla lente ad un ingrandimento di 30-40 diametri, si vede che ciascuno si distingue per contorni e disposizione caratteristici, ed a più forte ingrandimento, preparato sui coproggetti, si trova composto da una sola specie di microrganismi. Sono adunque altrettante colonie, ognuna delle quali costituisce una *cultura netta* di una data specie e resta così perfettamente isolata dalle altre, finchè continuando a crescere si confonde con quelle vicine.

Il modo con cui questi germi si sviluppano sulla superficie delle patate dimezzate suggerì al Koch l'idea di ottenere stabilmente culture separate di ciascuna specie, innestandola in una nuova fetta di patata; e difatti questa semplice idea costituisce il fondamento del metodo da lui seguìto, per ottenere coltivati isolatamente i microparassiti contenuti nell'organismo ammalato.

Scoperto il principio, rimaneva ancora a superare la difficoltà di comporre mezzi di nutrizione solidi, che servissero per la coltivazione di tutti i microrganismi patogeni; e siccome non si conosce un mezzo di nutrizione universale, che serva cioè allo sviluppo di tutte le specie di microbi, il Koch ha provveduto a ciò in maniera semplicissima, aggiungendo alle soluzioni nutritive ordinarie un certo quantitativo procentuale di *gelatina*, che le rende solide alla temperatura ordinaria. È questa la caratteristica che distingue il metodo del Koch da tutti gli altri precedenti, compreso quello di Klebs e di Brefeld colla semplice gelatina.

Bastano poche parole a far risaltare evidente la differenza che esiste fra i mezzi liquidi e le sostanze *solide e trasparenti*, ed i vantaggi grandissimi che queste offrono sui primi. Anzitutto nei liquidi i singoli microbi, sia passivamente sia pei movimenti propri di alcuni, si mescolano e si confondono gli uni cogli altri, tanto che riesce poi quasi impossibile la divisione delle singole forme: nei substrati solidi invece ciascun germe, sia mobile oppure no, rimane fissato al posto in cui si trova, completamente isolato da quelli vicini, e sviluppandosi diventa il punto centrale di una colonia novella, composta da esseri tutti eguali fra di loro per proprietà biologiche, fintantochè almeno non va a confondersi colle altre vicine, oppure finchè un germe cade dall'aria direttamente sulla stessa.

In secondo luogo, essendo il substrato nutritivo solido e trasparente, gli si può dare tal forma, che permetta l'osservazione diretta al microscopio con ingrandimenti di 80-120 diametri; e questo è un grande vantaggio, perchè molte specie hanno un modo caratteristico di svilupparsi in questi mezzi e si può così, quando si vuole, controllare direttamente la purezza delle culture.

Finalmente sono rese superflue in tal guisa le cautele grandissime, che prima si doveano avere per impedire che i germi dell'aria inquinassero le culture; poichè, quand'anche ciò avvenga, i germi si sviluppano sul luogo ove cadono e, salvo il caso raro in cui vadano a cadere precisamente su qualche colonia, non alterano l'andamento delle coltivazioni. Se poi germi stranieri si mescolano alle colonie che si stanno coltivando, lo si può facilmente riconoscere tanto all'aspetto macroscopico, come coll'osservazione microscopica fatta con debole ingrandimento; e se invece cadono e si sviluppano vicino a quelle, si è sempre in tempo ad innestarne una piccola quantità in un nuovo substrato, prima che le colonie dei germi accidentali sieno andate a confondersi con quelle che si ha interesse di mantenere pure.

Il problema adunque delle culture isolate, così difficile a risolversi per lo addietro, è ora addivenuto dalla più grande sem-

plicità; tutto si riduce a *diluire nelle cosidette « Gelatine nutritive »* (Nährgelatine), *liquefatte col calore, il materiale che contiene i microbi in proporzioni tali che, quando la gelatina si solidifica alla temperatura ordinaria, ciascun germe si trovi separato dagli altri e possa, sviluppandosi, formare una colonia a sè sul luogo su cui è stato fissato.*

Le sostanze proposte dal Koch sono varie: alcune sono composte semplicemente dall'aggiunta di gelatina alle soluzioni ed ai decotti usati per lo addietro, oppure all'estratto od infuso di carne, per renderli solidi alla temperatura dell'ambiente; altre invece, come il siero del sangue, sono rese solide per mezzo del calore. Di ciascuna esporremo ora in dettaglio la composizione e il modo di prepararla e di usarla per ottenervi le culture isolate. Incominciamo dal substrato solido, ma non trasparente, che ha servito di base al perfezionamento del metodo, dalla patata.

Patate.

Si preparano anzitutto lavandole accuratamente e togliendo la terra, che sta fra le anfrattuosità della superficie, con una spazzola rude; si lasciano immerse per un'ora circa in una soluzione di sublimato a $^1/_2$ $^0/_0$, si lavano di nuovo con acqua e si pongono nel recipiente di latta entro l'apparecchio di sterilizzazione a vapore, descritto a pag. 70, per farle cuocere nella corrente di vapor d'acqua a 100° C. per una mezz'ora. Questo tempo è sufficiente perchè le patate si cuocano senza screpolarsi. Quando si vogliono adoperare, si preparano prima le grosse campane di vetro doppie, lavandole colla soluzione di sublimato all'1: 1000, e ricoprendone il fondo con carta da filtro più volte doppia e bagnata colla stessa soluzione. Si prende la patata, dopo averla lasciata raffreddare, fra il pollice e l'indice della mano sinistra, precedentemente bagnati nella soluzione di sublimato, e con appositi coltelli a lama lunga, larga e sottile, precedentemente arroventati e fatti raffredare, si taglia per metà. Per

depositare le due metà nella campana di vetro, si stacca prima dal coltello quella inferiore e si depone, lasciando in questo tempo l'altra metà colla superficie di taglio aderente al coltello e rivolta all'ingiù; si deposita quindi anche questa e si ricopre la campana, facendo il tutto più rapidamente che si può, per impedire che cadano germi dall'aria sulle superficie di taglio. Bisogna pure avere l'avvertenza di non toccare la patata che colle dita della mano sinistra, bagnate di sublimato, e di evitare di toccare anche con questa i margini della superficie della stessa. Per ogni singola patata si usa un coltello recentemente sterilizzato.

La *seminagione* o l'*innesto* (parlando di mezzi solidi è preferibile quest'ultimo termine) del materiale che contiene i microbi si deve fare subito dopo avere spaccato le patate: si fa prendendo col filo di platino, diritto o ripiegato ad ansa e previamente arroventato, una piccola parte di quel materiale e disegnando parecchie strie sulla superficie di taglio della patata, in modo da distribuirlo sulla maggior parte di quella senza giungere a toccarne i margini. Questo si deve fare specialmente quando la sostanza da innesto contiene parecchie specie di microbi e si desidera separarli gli uni dagli altri, acciò che si sviluppino isolati lungo le strie disegnate dall'ago di platino. Se si ha già a che fare con un materiale puro, basterà invece deporlo strisciando leggermente sul mezzo della patata. I germi si sviluppano per lo più alla temperatura dell'ambiente, altrimenti si portano le campane nella stufa a quel grado di calore che è necessario.

Per trapiantare le colonie da una patata in un'altra, o da queste in altre sostanze di nutrizione, si ripete l'operazione anzidescritta, dopo avere bensì controllata la purezza della cultura coll'aiuto della lente d'ingrandimento e coll'esame microscopico di una piccola parte di quella, distesa su di un coproggetti e colorita. La chiusura ermetica dell'ingresso dell'aria nelle culture che si praticano sulle patate non è necessaria, giacchè se anche vi si deposita qualche germe, questo si sviluppa sul luogo dove cade e si può coll'innesto successivo in un'altra patata salvare le culture, prima che sieno inquinate da altri microbi.

Le patate sono adunque un substrato materiale assai economico e adatto per la coltivazione dei microparassiti; hanno però l'inconveniente che le colonie di alcuni di questi non appaiono molto visibili sulla loro superficie, e che inoltre sono adatte soltanto per lo sviluppo di un numero limitato di specie. Così, a mo' d'esempio, vi crescono bene il « bacillus anthracis », quello dell'edema maligno, quello della morva, il micrococco della polmonite ed alcune specie cromogene; difatti il « micrococcus prodigiosus e l'aurantiacus », i batteri del pus verde e del pus bleu, quelli del latte bleu, ecc. vi formano colonie bellissime. Adesso però l'uso delle patate è ristretto specialmente alla dimostrazione del metodo, giacchè non sono, come la gelatina, adatte a separare i microrganismi patogeni da quelli indifferenti, specialmente perchè i microbi della putrefazione trovano sulle patate un terreno così favorevole al loro sviluppo, che predominano facilmente sugli altri. Per la coltivazione dei microparassiti le patate oggidì non servono, se non quando questi si sono già ottenuti in cultura isolata e si vuol sapere se si sviluppano o no nei substrati vegetali.

Le patate possono essere anche utilizzate per lo studio dei germi dell'aria; per quanto, come si è detto, tali ricerche ora si facciano con processi più esatti e con mezzi diversi.

Invece delle patate dimezzate, si può usare una specie di pappa fatta colle patate cotte, frantumate e poste nelle boccette coniche, cosidette di Erlenmeyer, con tanta acqua quanta è necessaria per farne una pasta densa, che si fa poi sterilizzare nell'apparecchio a vapore. A questa pappa di patate si può aggiungere amido, zucchero, peptone, infuso od estratto di carne e comporre così un buon substrato materiale, su cui si possono ottenere in grandi quantità culture nette di molti microparassiti.

Fra i mezzi di nutrizione solidi, ma non trasparenti, va annoverata eziandio la

Pappa di pane.

Si prepara facendo disseccare bene il pane nero ordinario, tagliato a fette sottili e posto in mezzo a fogli di carta bibula, e pestandolo in un mortaio ben pulito. Si pongono 10 grammi di questa polvere in una bottiglia di Erlenmeyer, vi si aggiungono 30 gr. di acqua e si fa sterilizzare nella corrente di vapore acqueo a 100° C. per $^1/_2$ ora. Il pane nero reagisce sempre fortemente acido, e se si è usato il pane bianco, si acidifica leggermente la pappa coll'acido fosforico o col fosfato acido di soda.

La pappa di pane serve bene specialmente per la coltivazione dei funghi delle muffe.

Gelatina nutritiva.

Ho già detto che si possono rendere solidi alla temperatura ordinaria tutti i liquidi, già prima usati per la coltivazione dei microrganismi, mediante l'aggiunta di una certa quantità procentuale di gelatina, in modo da trasformarli in altrettanti mezzi di nutrizione *solidi* e *trasparenti*. Si possono avere così varie specie di gelatina nutritiva, composte dai diversi infusi o decotti vegetali, ognuna delle quali è specialmente adatta allo sviluppo di certe specie di microbi. Il Koch ha cercato anche di comporre un substrato materiale che servisse, se non per tutti, almeno per la maggior parte dei microparassiti che finora si conoscono, ed ha trovato che quello che meglio di ogni altro corrisponde allo scopo è l'*infuso di carne con peptone, mescolato colla gelatina* in proporzioni variabili dal 5 al 10 °/₀ *(Fleischwasser-pepton-gelatine)*. In questo mezzo si sviluppano la maggior parte dei microrganismi patogeni alla temperatura dell'ambiente (17°-19° C.); ve ne sono però alcuni i quali non si riproducono che a temperatura più elevata, corrispondente cioè alla temperatura del sangue, nella quale la gelatina non si mantiene più solida. Il D.re Hesse ha allora pensato di sostituire la gelatina con un'altra sostanza che è l'*agar-agar*, una specie di alga, la quale per mezzo della cottura si rammollisce e diventa gelatinosa, mantenendosi solida fino a 40° C. L'uso di questa sostanza è ora infatti molto diffuso, avendo anche il vantaggio sulla gelatina di non diventare liquida facilmente come questa, per opera dello sviluppo di certi microbi, sicchè le colonie che vi si sviluppano si possono più lungamente mantenere isolate.

Il modo di preparare la gelatina con infuso di carne e peptone è il seguente.

Si prepara alla sera ½ chilo di carne di vitello, magra e pestata finamente, in 1 litro di acqua distillata e sterilizzata e si

lascia stare tutta la notte sul ghiaccio o in un luogo fresco. Al mattino seguente si toglie accuratamente con carta da filtro il grasso raccolto alla superficie, si rimescola e si preme entro un torchio speciale, simile a quello che usano i farmacisti. Questo strumento però non è necessario, e basta anche di spremere semplicemente la carne attraverso un filtro di tela, precedentemente sterilizzato nella corrente di vapor d'acqua. Si aggiunge al liquido spremuto tanta acqua quanta è necessaria per fare di nuovo la misura di un litro, e vi si mescola 1 % di peptone secco purissimo (ossia 10 gr. per litro) e $^1/_2$ % (ossia 5 gr.) di sale di cucina, ponendovi dentro la gelatina in fogli, di 1ª qualità, perchè si rigonfi ($^1/_2$ ora circa). Il quantitativo procentuale che si deve aggiungere di questa sostanza varia, come ho detto, dal 5 al 10 %, secondo l'uso che se ne deve fare; se si vogliono fare culture in gelatina entro i tubi da saggio, basta già il 5 %, quando invece la si voglia distendere sui portoggetti o sulle lastre di vetro, e deve essere perciò più consistente, allora serve meglio un contenuto procentuale del 10 %. E da osservare però che se la quantità di gelatina è considerevole, lo sviluppo dei microbi nella stessa si fa più lento, cosicchè a me sembra più conveniente, per qualsiasi forma si debba dare a questa sostanza di nutrizione, di aggiungere all'infuso di carne il 7 o l'8 % di gelatina, con che si ottiene un grado tale di consistenza, da renderla atta a qualunque uso.

Quando la gelatina si è rigonfiata, si riscalda leggermente per disciogliera del tutto e quindi, essendo questa sostanza sempre acida, si neutralizza accuratamente versandovi a goccia a goccia una soluzione concentrata di carbonato di soda o di fosfato basico di soda. Questo è il momento più delicato dell'operazione, giacchè la gelatina dev' essere assolutamente *neutra*, oppure tendente leggermente all'alcalino; si saggia perciò di quando in quando la reazione con due carte reattive di laccamuffa, una bleu e l'altra rossa, e si sospende l'operazione allorchè quella bleu rimane inalterata e quella rossa si tinge *leggermente in bleu*. Questo grado [illegible]azione debolmente alcalina è

il più adatto per lo sviluppo della maggior parte dei microparassiti. In certi casi si può anche avere interesse di ottenere una reazione fortemente alcalina; ma se invece si è ecceduto col carbonato di soda, vi si rimedia facilmente aggiungendovi qualche goccia di soluzione di acido lattico.

Si fa cuocere quindi il miscuglio a bagno maria, oppure nell'apparecchio di sterilizzazione a vapore per $^1/_2$ od 1 ora, ed in tal guisa tutta l'albumina precipita e si raccoglie al fondo ed alla superficie, insieme coi precipitati prodotti dalla neutralizzazione; la massa perde il suo colore rossastro ed acquista una tinta giallo-paglierina. L'albumina deve precipitare completamente, e per assicurarsi di ciò si filtra una piccola quantità di liquido entro un tubo da saggio e si fa cuocere di bel nuovo; se non compare alcun intorbidamento fioccoso, si è sicuri che non vi è più albumina, altrimenti si deve prolungare ancora la cottura. Non bisogna tener conto di una leggera tinta lattiginosa, che prende sempre la gelatina quando si riscalda, e che è dovuta ai fosfati: quest'opacamento scompare difatti più tardi col raffreddamento.

Fig. 15.

Dopo avere cotta e neutralizzata la gelatina, si filtra attraverso un doppio strato di carta da filtro svedese, bagnata con acqua distillata e sterilizzata, in un *imbuto ad acqua calda* (Fig. 15), nel quale l'acqua che sta fra le due pareti di rame è mantenuta calda per mezzo di un cerchio di piccole fiammelle, situato alla base dell'imbuto. Questo dev' essere preparato netto, più che si può, e deve restare coperto durante la filtrazione. Quando non si possegga questo imbuto speciale, si filtra la gela-

tina rapidamente, a piccole quantità, in altrettanti imbuti di vetro, che si mantengono caldi avvicinandovi con cautela una fiamma ad alcool.

La gelatina filtrata, chiara, d'un bel giallo topazzo si mette entro i tubi da saggio, sterilizzati a 160° C. nella maniera già esposta, riempiendoli fino ad $^1/_3$ circa dell'altezza e badando a non imbrattare colla gelatina nè i loro margini, nè il terzo superiore della superficie interna, ove deve entrare il turacciolo di cotone, per evitare che questo aderisca al vetro e non si possa poi togliere facilmente. Il riempimento dei tubi si fa per mezzo di una grossa pipetta di vetro sterilizzata.

La sterilizzazione della gelatina contenuta nei tubi si opera in maniera discontinua, riscaldando i tubi stessi nell'apparecchio a vapor d'acqua per 10 o 15 minuti al giorno, 4 o 5 giorni consecutivi. Se non si ha quest'apparecchio, si fa cuocere un tubo per volta per 10 minuti direttamente sulla fiamma di una lampada, badando a che non si formi molta schiuma e che questa non vada a toccare il turacciolo. Quando la gelatina è già preparata da un pezzo e comincia a diminuire di volume per l'evaporazione, si deve, prima di adoperarla, riscaldarla e cuocerla di nuovo. Per meglio impedire l'evaporazione e l'ingresso dei germi, si possono coprire i tubi con calotte di gomma elastica o con carta pergamena.

La gelatina così preparata fonde ad una temperatura che oscilla fra 20-25° C.; non si può precisare *a priori* il grado esatto di calore a cui diviene liquida, poichè questo dipende, oltrechè dal contenuto di gelatina, anche dal grado di neutralizzazione e da altre circostanze. Se la gelatina non è completamente sterilizzata, dopo 5-10 giorni, osservandola bene per trasparenza, si cominciano a vedere alcuni piccoli punticini opachi e biancastri, che rappresentano l'inizio dello sviluppo di altrettante colonie di microbi; ed allora non si ha che farla cuocere ancora una volta per ucciderli tutti. Il poter riconoscere così lo sviluppo di germi fin da principio è un vantaggio non indifferente, sia perchè in tal modo si può sterilizzare di nuovo, senza che vada perduto il materiale di nutrizione, sia anche perchè, quando nessuna colonia si è vista sviluppare dopo un certo numero di giorni (8 o 10 al più), da che la gelatina si è preparata e tenuta alla temperatura dell'ambiente, si può essere sicuri della sua purezza.

La gelatina offre anche il vantaggio di lasciar riconoscere la sorgente

da cui è derivata qualche impurità: chè se, ad es., vi cadono germi dal turacciolo d'ovatta, non bene sterilizzato o non abbastanza compatto, si vedranno le relative colonie svilupparsi sulla superficie e non dentro la massa della stessa; e se invece i germi erano rimasti aderenti al vetro, come accade per lo più, si vedrà in questo punto l'origine delle colonie. Si è adunque in grado così di poter controllare ad ogni momento la purezza del substrato materiale che si adopera, e di potere tener lungi in tal guisa una delle cause principali di errori possibili. Non tutte le specie di gelatina si ottengono sterilizzate nell'istesso tempo; così la gelatina mescolata coll'urina alcalina o col liquido nutritivo del Pasteur (1) (tartrato di ammonio 1 parte, zucchero candito 10 e le ceneri di 1 parte di feccia di vino in 100 di acqua) si riesce a sterilizzarla con una sola cottura, mentre la gelatina con estratto o con infuso di carne, come quella coll'infuso di fieno, bisogna cuocerla ripetutamente per qualche giorno consecutivo.

La gelatina con infuso di carne e peptone, a reazione neutra o debolmente alcalina e preparata nel modo finora descritto, si è detto che serve assai bene per lo sviluppo dei microparassiti; ma anche questa non è adatta egualmente per tutti, giacchè quelli appartenenti alla classe degli *ifomiceti* non vegetano bene nello stesso substrato in cui si sviluppano i cosidetti « batteri », e di questi stessi taluni vegetano meglio in un mezzo alcalino ed altri invece in una sostanza neutra od anche acida. Se si tratta adunque di ricerche nuove, si devono usare contemporaneamente diverse qualità di gelatina nutritizia.

Invece dell'infuso di carne si può adoperare, quasi collo stesso vantaggio, una soluzione di estratto di carne al 5 %, con o senza aggiunta di zucchero. L'Hueppe consiglia la formola seguente: Peptone 3 %, zucchero d'uva o zucchero di canna greggio 0,5 %, estratto di carne 0,5 % e gelatina 5-10 %.

A lato di questa va annoverata la *gelatina con infuso di fieno*, specialmente adatta per alcune specie di bacilli, la *gelatina preparata con infuso di frumento* o coll'*umore acqueo* e finalmente la *gelatina mescolata col siero di sangue*, proposta dal Koch (2), che è migliore di tutte le altre per lo sviluppo di alcuni microrganismi patogeni. Il modo di prepararla è semplicissimo; si mescola a parti eguali il siero del sangue, raccolto colle dovute cautele, con una soluzione di gelatina al 5 % e si sterilizza il miscuglio entro i tubi da saggio per parecchi giorni di seguito, ½-1 ora al giorno, nel bagno maria o nell'apposita stufa a 52° C.

Ma tutte queste varie specie di gelatina nutritiva non si possono adoperare che ad una temperatura inferiore ai 25° C.; giacchè a questo grado di calore la gelatina è già liquida completamente

---

(1) Pasteur, Annales de chimie et de physique. Bd. 58, p. 323.
(2) Koch, Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. I, p. 27.

ed ha perduto i vantaggi dei materiali solidi e trasparenti. Per conservare cotesti vantaggi anche ad una temperatura eguale a quella nostra del corpo, si usa, come ho detto, invece della gelatina animale, quella gelatina vegetale, cosidetta *agar-agar*, che si ricava dalla « Gracilaria lichenoides » e dalla « Gigartina speciosa ».

La formola per la preparazione dell'agar-agar è la seguente (Koch).

500	ccm.	acqua distillata e sterilizzata
3 $^1/_2$	gr.	agar-agar tagliata finamente
5	»	peptone
2 $^1/_2$	»	sal di cucina
2 $^1/_2$	»	estratto di carne Liebig.

Si fa cuocere dapprima l'agar-agar soltanto nell'acqua entro l'apparecchio di sterilizzazione a vapore per tre ore, finchè si è completamente disciolta e si è separata quella parte che coagula col calore. Si aggiungono gli altri ingredienti, si neutralizza colla soluzione di carbonato di soda e si fa cuocere di nuovo nel vapor d'acqua per $^1/_2$ ora, per eliminare nuovamente le sostanze coagulabili ed i precipitati prodotti dalla neutralizzazione. Si lascia stare 12 ore, si riscalda di nuovo e si filtra nell'imbuto ad acqua calda, ricevendo il filtrato direttamente nei tubi da saggio. Siccome passa lentamente attraverso il filtro, può talora essere necessario di adoperare per ogni tubetto un nuovo filtro di carta svedese.

Il Rosenbach (1) consiglia di sostituire semplicemente alla gelatina, nella preparazione di questa coll'infuso di carne, l'1,5 o il 2 $^0/_0$ di agar-agar, lasciandola rigonfiare per 24 ore in una ghiacciaia e cuocendola quindi come sopra, oppure facendola riscaldare subito lentamente per discioglierla prima di cuocerla. La soluzione ancor calda si neutralizza fino a reazione debolmente alcalina col fosfato basico di soda, e si fa cuocere di

(1) Rosenbach, *Mikroorganismen bei den Wundinfectionskrankheiten des Menschen*, Wiesbaden 1884.

nuovo per 2 ore nel bagno maria, o per 1 ora nella corrente di vapore acqueo. Il Rosenbach dice che si filtra meglio attraverso l'ovatta, tenendo durante la filtrazione l'imbuto ed il recipiente ove si raccoglie il filtrato entro l'apparecchio a vapore. Si può anche mescolare insieme l'agar-agar e la gelatina, mettendo $^1/_2$ $^0/_0$ di gelatina e 1-2 $^0/_0$ di agar-agar.

È da avvertire che non sempre si ottiene lo stesso grado di consistenza, perchè l'agar-agar colla cottura si discioglie ora più ora meno completamente.

L'agar-agar non si ottiene mai perfettamente trasparente come la gelatina, ed alcune specie di microrganismi vegetano in quella più lentamente. Ha il vantaggio però che a 40° C. è ancora solida, ed anche se il contenuto di agar-agar è soltanto di 1, 5 $^0/_0$, si mantiene solida e trasparente fino a 37° C. Ha inoltre il vantaggio notevolissimo che non si fluidifica per lo sviluppo di certi microbi, che liquefanno la gelatina, e permette così lo svilupparsi in superficie degli stesssi coi loro aggruppamenti caratteristici, servendo di complemento alle culture fatte nella gelatina ordinaria.

Ora che è stato esposto il modo di preparare le varie qualità di gelatina, vediamo quale è la via da tenere per coltivare in questa i microparassiti ed ottenerli isolati in culture nette da qualsiasi impurità.

Culture nei tubi da saggio.

È questa la forma più comune che si da alla gelatina per le coltivazioni, ed è anche la più adatta *sia per conservare al riparo dalle impurità il materiale che si è già ottenuto allo stato di purezza, sia per istudiare alcune particolarità caratteristiche dello sviluppo dei microrganismi.*.

Per fare gli *innesti* del materiale da coltivazione nella gelatina contenuta nei tubi da saggio, si procede come segue. Anzitutto bisogna assicurarsi bene che il turacciolo di ovatta non

sia aderente al tubo e si possa togliere con facilità; nel caso che si trovi aderente, si distacca girandolo ripetutamente senza muoverlo da posto. Si prende quindi il tubo fra le dita, abbracciandone la parte superiore coll'indice della mano sinistra in modo, che la porzione inferiore che contiene la gelatina poggi sul dorso delle tre ultime dita e l'orifizio del tubo sia rivolto all'ingiù, per evitare che durante l'operazione vi cadano germi dall'aria. Si prende colla destra la bacchetta di vetro coll'ago di platino a mo'di una penna da scrivere, si bagna la punta dell'ago sterilizzato (diritta, o ripiegata ad ansa secondo la quantità di materiale che si vuol prendere) nel materiale da innesto, si toglie col quarto e quinto dito della stessa mano il turacciolo dal tubo e si infigge nella massa gelatinosa l'ago che porta i microbi per tre o quattro volte, richiudendo quindi il tubo immediatamente (Fig. 16).

Fig. 16.

Il modo di svilupparsi e l'aspetto che assumono nella gelatina le varie specie di microrganismi costituisce una delle particolarità più interessanti per lo studio delle proprietà biologiche di questi esseri. Taluni infatti fluidificano la gelatina circumambiente ed altri no; ed in quest' ultimo caso si vedono alcune specie svilupparsi egualmente nell' interno, lungo il tragitto percorso dall'ago di platino, e sulla superficie, ed altri invece, che sono prevalentemente aerobi, si espandono di preferenza al disopra della gelatina, ora prendendo l'aspetto della capocchia di un chiodo, che dal Friedländer si ritiene caratteristico del micrococco della pneumonite, ed ora invece distendendosi superficialmente a mo' di un velo, o sotto forma di anello. Nell'interno taluni si sviluppano come piccoli globicini opachi, ed altri sotto forma di filamenti più o meno regolari, oppure a mo' di una nubecola appena visibile, come avviene pel sottilissimo bacillo della setticemia dei topi. Del pari che la forma varia anche moltissimo il colore delle singole colonie, colore che si manifesta per influenza diretta dell'aria e della luce.

Quando la specie che si sviluppa fluidifica la gelatina, si può vedere la colonia assumere un aspetto imbutiforme (microbi del colera indiano), oppure la fluidificazione procedere a strati e più o meno rapidamente, a seconda dei vari microrganismi. Al fondo dell'imbuto, oppure nel limite che separa lo strato liquido dalla parte di gelatina ancora solida, si precipitano i microbi sotto forma di nube opaca di vario colore: questi però talora si raccolgono anche alla superficie in forma di pellicola. Anche nel caso che la gelatina divenga liquida, si manifestano le colorazioni diverse caratteristiche.

Tutte queste particolarità sono assai interessanti da rilevarsi, perchè costituiscono altrettante proprietà biologiche *fisse*, *inerenti e caratteristiche* di ciascuna specie e servono perciò a facilitarne il diagnostico differenziale; ed anche perchè si può con tal mezzo controllare la purezza delle culture e constatare facilmente la presenza di altre forme di microrganismi.

La coltivazione nei tubi si adopera con vantaggio quando il materiale si ha già allo stato di purezza; ma allorquando invece si vogliono coltivare isolate parecchie specie di microbi, che si trovano mescolati insieme, si usa quest'altro processo seguente.

Culture sulle lastre di vetro e sui portoggetti.

Questo metodo di cultura ha per iscopo di distribuire i vari germi, che si trovano insieme ammassati in un dato materiale, in una superficie di nutrizione così grande, che rimangano separati gli uni dagli altri ed abbia origine così da ciascuno una colonia pura, dalla quale si possa prendere il materiale d'innesto, per trasportarlo nei tubi di gelatina e quivi conservarlo nel modo anzidetto.

Questo intento si può raggiungere in doppia maniera.

a) Si diluisce una piccolissima quantità della sostanza che porta i germi colla gelatina liquefatta, contenuta in un tubo da saggio (10 cm. circa), e si riversa su di una lastra di vetro, ove si distende e diventa solida in larga superficie.

b) Oppure si distende prima la gelatina sulla lastra, o sopra un certo numero di portoggetti o di piccole capsule di vetro, e quando si è solidificata, si disegnano sulla stessa coll'ago di platino, imbrattato col materiale da cultura, una serie di strie parallele, nell'intento di disseminare lungo le stesse i germi che si trovavano riuniti nella sostanza primitiva.

Le lastre di vetro, quali sono adoperate nel laboratorio del Koch, hanno una lunghezza di 12-13 cm. per 10 di larghezza, e su ciascuna si distende la gelatina contenuta in un tubo da saggio. Però l'osservazione microscopica a debole ingrandimento

delle colonie che vi si sviluppano non si può fare in queste che con un microscopio semplice appositamente costrutto, oppure con un microscopio composto che abbia un tavolo assai grande. Per poter fare adunque l'osservazione coi microscopi ordinari, è preferibile usare lastre di vetro di 10 cm. di lunghezza su 5 di larghezza, e distribuire in due, anzichè in una lastra soltanto, la gelatina contenuta in un tubo da saggio. In tal guisa si ha ancora il vantaggio di poter osservare con comodo una delle lastre al microscopio, senza timore di contaminare la gelatina coi germi dell'aria, restando l'altra per riserva sempre al riparo, per trarne poi il materiale per le culture isolate.

Le lastre di vetro, i portoggetti o le piccole capsule, accuratamente puliti (acidi minerali, acqua, alcool) e disinfettati a 150-160° C. per due ore nel modo già descritto, si dispongono sopra i banchetti di vetro dentro una campana, collocata sul piatto dell'apparecchio livellatore disegnato nella fig. 17. Si girano le viti di cui è munito il treppiedi metallico, fino a che il livello dimostra che la lastra si trova in posizione orizzontale, e l'apparecchio è pronto. Sotto la lastra si può mettere un recipiente con ghiaccio, quando si voglia far solidificare la gelatina rapidamente. È da notare ancora che le lastre di vetro sterilizzate devono essere estratte dalla scatola di ferro che le contiene, prendendole pei margini colla punta di due dita bagnate prima nella soluzione di sublimato. I banchetti di vetro si sterilizzano bagnandoli rapidamente nella stessa soluzione, e si ricoprono quindi con uno strato di carta bibula; con questa si tappezza pure il fondo della campana, che deve essere bagnata per servire quale camera umida ed impedire il disseccamento della gelatina distesa.

Fig. 17.
Apparecchio livellatore con campane di vetro.

Si fluidifica a bagno maria alla temperatura di 30° C. la gelatina, oppure per essere più sicuri della sua sterilizzazione, si fa cuocere ancora una volta sulla fiamma ad alcool e si lascia raffreddare fino al grado di calore anzidetto. Si prende colla mano destra, come si è già descritto, l'ago di platino foggiato ad ansa nella sua estremità, precedentemente arroventato e bagnato nel materiale da innesto, si tiene il tubo colla gelatina liquefatta a 30° nella sinistra, alquanto inclinato all'ingiù, senza però che la gelatina giunga a toccare l'ovatta, si apre e si immerge l'ago nel liquido gelatinoso strisciandolo lungo le pareti del tubo ed agitandolo ripetutamente per operare il miscuglio. Si richiude quindi il tubo immediatamente e si cerca di distribuire il materiale nella gelatina più uniformemente che si può, girando e piegando il tubo in ogni verso.

Se i germi che si vogliono isolare non sono molto numerosi, è sufficiente questa prima diluzione, che si distende sulla lastra; ma se la quantità di quelli è grande, come quando ad es. si tratta di isolare i germi di un fiocco di contenuto intestinale o di un liquido putrefatto, una sola diluzione in 10 ccm. di gelatina non è sufficiente a far sì che nella gelatina stessa distesa ognuno di quelli si sviluppi in colonia isolata, così distante dagli altri da poterne osservare le proprietà di sviluppo ed ottenerne anche coltivazioni nette. In tal caso si fa una seconda, e se occorre, anche una terza diluzione nel modo che segue. Si fanno fluidificare tre tubi di gelatina, e dopo di aver trattato il primo nella maniera ora descritta, si prendono da questa prima miscela tre o quattro goccioline di liquido coll'ansa del filo di platino e si portano, l'una dopo l'altra, nel secondo tubo, dove si mescolano accuratamente; da questo si prende di nuovo la stessa quantità di liquido e si mescola nel terzo tubo. Nel fare tali innesti successivi è necessario avere una piccola avvertenza: ogni volta che, dopo aver mescolato una gocciolina di liquido gelatinoso *infetto* (chiamiamolo così) colla nuova gelatina, si immerge di bel nuovo l'ansa di platino nel primo tubo per prenderne un'altra goccia, bisogna badare di agitare bene l'ansa stessa entro il

tubo, perchè si distacchi la gelatina pura che necessariamente vi rimane adesa nel fare l'innesto, e che impedirebbe che l'ansa prendesse di nuovo il materiale che si vuole diluire.

In tal guisa si riesce ad ottenere nella seconda o nella terza diluzione i germi sufficientemente divisi, perchè se ne possano studiare le proprietà caratteristiche di sviluppo. Ma si può anche raggiungere lo stesso scopo e risparmiare la gelatina, facendo le diluzioni del materiale nell'acqua sterilizzata, delle quali si mescolano poi alcune goccie colla gelatina.

Per versare la gelatina sulle lastre di vetro, si fa in due modi: o si aspira la gelatina in una grossa pipetta sterilizzata e si lascia sgocciolare sulla lastra, oppure si versa su questa direttamente dal tubo; ed in tal caso bisogna prima riscaldare alla lampada l'orifizio del tubo stesso, per uccidere i germi che vi possono essere aderenti. Prima di versare la gelatina, bisogna aspettare che sia raffreddata tanto da essere prossima al punto di solidificazione, che sia, cioè, di una consistenza semifluida, senza che però contenga ancora alcun grumo; altrimenti, se è molto fluida, si espande in lamina troppo sottile e si dissecca poi facilmente. La gelatina si versa sempre nel mezzo della lastra e si distende quindi rapidamente, per mezzo di una bacchetta di vetro precedentemente arroventata e lasciata raffeddare, fino ad 1 cent. di distanza dall'orlo del vetro; si copre subito e si lascia solidificare.

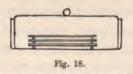



Fig. 18.

Le lastre si dispongono in serie entro la campana l'una sopra l'altra (Fig. 18) su piccoli banchetti, formati da una lastra di zinco lunga 16 cm., larga 4 e ripiegata per 1-1,5 cm. alle due estremità, oppure da una lamina di vetro lunga 13-14 cm. e larga 4 cm., alle cui due estremità si fissa col balsamo del Canadà una lista stretta di vetro, dello spessore di 5-6 mm. Se si sono fatte parecchie diluzioni nella gelatina, si pone la prima nel banchetto inferiore segnandola col N. 1, sopra di questa si mette la seconda (N. 2) e quindi la terza, e cosi di seguito finchè ne entrano nella campana. In luogo delle campane di vetro si possono usare

egualmente due zuppiere di terra cotta, ben pulite e coperte di carta bibula, bagnata nella soluzione tenue di sublimato; si rovesciano l'una sull'altra, e si pone fra queste la lastra di vetro.

Al secondo o terzo giorno si vede già ad occhio nudo, sul luogo dove sono rimasti fissati i singoli germi, cominciare lo sviluppo di altrettante colonie sotto forma di piccoli punticini, ciascuno dei quali rappresenta una cultura netta. È molto interessante seguire l'andamento ulteriore di queste culture, che è diverso per ciascuna specie, per quanto l'individuo cellulare appaia anche uguale morfologicamente.

La distinzione più generale delle varie specie di microbi, riguardo al loro modo di svilupparsi sulla gelatina, si è che *alcuni fluidificano il substrato materiale su cui si sviluppano ed altri no.* Dei primi taluni fluidificano la gelatina sviluppando un odore per lo più sgradevole, ed altri invece senza odore di sorta; taluni non producono la fluidificazione che dopo un certo tempo, ed altri invece la producono rapidissimamente. In quest'ultimo caso, se si vuole ottenere quella data specie in cultura isolata, bisogna fare il trapiantamento assai presto, prima che vada a mescolarsi colle colonie vicine, e prendere sempre *dai margini* il materiale da innesto. In quelli poi che non fluidificano la gelatina, l'aspetto delle colonie è assai diverso per forma e per colore, come già si è accennato.

Non bisogna inoltre mai trascurare l'osservazione microscopica *a debole ingrandimento e con un diaframma stretto*, di ciascuna colonia; giacchè questo è uno dei più grandi vantaggi che offre la gelatina trasparente sugli altri mezzi solidi di nutrizione. Si usa per ciò un ingrandimento variabile da 80-150 diametri (quale è dato ad esempio dell'obb. Hartnack 4, ocul. 3, oppure dall'obb. Zeiss A, ocul. 4) e l'apparecchio di Abbe con un diaframma stretto, per osservare di ciascuna colonia l'aspetto caratteristico (granuloso, a liste, a filamenti intrecciati o cristallino), il colorito, i margini ed il modo di comportarsi della gelatina ambiente; e finalmente per vedere se sopra, sotto o a lato della colonia che si osserva vi è qualche altro ammasso di microrganismi.

L'aspetto delle singole colonie è assai diverso e per lo più caratteristico per ciascuna specie. Così i bacilli del carbonchio formano fiocchi composti di filamenti lunghi, a forma di fasci o di ricci intrecciati fra di loro, di apparenza elegantissima ed immobili. Invece i « bacilli del fieno » (*Heubacillen*) si sviluppano in filamenti soltanto in principio, ma ben presto la gelatina si fa liquida ed in mezzo a questa i bacilli stessi si muovono, mentre alla periferia la colonia assume l'aspetto di una corona raggiata. I finissimi « bacilli della setticemia dei topi » si sviluppano in colonie, facilmente riconoscibili a debole ingrandimento pel loro splendore matto e per la fine granulosità.

Controllata così al microscopio la purezza delle culture (se si è ancora incerti, se ne fa anche una preparazione colorata su di un coproggetti), quando si vogliano conservare isolate, se ne prende una piccola porzione,

sempre dai margini, coll' ago di platino e si innesta in un tubo con gelatina. Se le colonie sono abbastanza grosse, quest'operazione si fa ad occhio nudo; altrimenti si porta la lastra sul tavolo del microscopio, si osserva quella certa colonia che si vuol avere isolata e si fa strisciare l'ago di platino, coll'estremità ripiegata ad uncino, sulla superficie della gelatina senza toccarla, tenendo fissa la mano col mignolo poggiato sulla lastra in un punto ove non è gelatina; quando si è giunti col piccolo uncino nel campo di osservazione, precisamente al disopra della colonia che si è presa di mira, s'immerge in questa la punta dell'ago e si rialza quindi verticalmente, assicurandosi sempre col microscopio di aver toccato realmente quel punto che si voleva, e che una parte della colonia è rimasta aderente al filo di platino. Questa manovra è alquanto delicata, ma con un po' di esercizio riesce facilmente.

Si è detto che una seconda maniera di ottenere lo sviluppo isolato di parecchi germi, colla distribuzione e fissamento degli stessi nella gelatina, è quello degli *innesti lineari*. Si aspira in una pipetta sterilizzata la gelatina pura, liquefatta a 30° C., si fa scorrere sulle lastre di vetro, oppure sopra un certo numero di portoggetti sterilizzati, situati orizzontalmente, in modo che la gelatina raffreddandosi formi uno strato dello spessore di qualche millimetro, distante alquanto dai margini del vetro. Per ottenere ciò, bisogna lasciar raffreddare la gelatina fino a consistenza semisolida, prima di versarla. Coll'ago di platino diritto (non più coll'estremità ripiegata ad ansa, la quale prenderebbe una quantità di materiale troppo grande), sterilizzato come di solito e bagnato nella sostanza che contiene i microbi, si disegnano rapidamente sui portoggetti, prima che la gelatina sia completamente solificata, da 3 a 5 strie trasversali, distanti 2-3 cm. circa l'una dall'altra; oppure sulle grandi lastre di vetro si pratica un certo numero di strie parallele, in modo che l'istromento solchi la gelatina senza giungere a toccare il vetro. Quest'operazione coll'ago sulla gelatina si compie all'incirca come un innesto di vaccino sul braccio, per cui l' espressione generale di « innesto » è in questo caso benissimo appropriata. I portoggetti o le lastre si dispongono quindi sui banchetti di vetro entro le campane.

In tal guisa i microbi si distribuiscono separati gli uni dagli altri e quivi fissati si sviluppano in altrettante colonie, che si osservano poi al mi-

croscopio con ingrandimenti deboli e si trapiantano nei tubi da saggio con gelatina, per conservarle come già si è detto.

Quando in un solco si sviluppano parecchie colonie, se ne prende di ciascuna (aiutandosi col microscopio semplice che ingrandisce 15-20 volte) una piccola parte coll'ago di platino e si innesta in altrettanti portoggetti, fino a che si giunge ad avere sviluppata su ciascuno una sola forma di microrganismi. Quando poi, dopo averli coltivati per 2 o 3 generazioni sui portoggetti, si è constatato che le colonie conservano inalterate le proprietà morfologiche macro- e microscopiche, allora si innestano nei tubi di gelatina e si conservano. Anche qui per risparmiare la gelatina, se il materiale è ricco di germi, si può diluire prima nell'acqna sterilizzata e fare quindi con questa gli innesti a strie sulla gelatina.

Con questo metodo degli « innesti lineari » non si riesce così bene ad isolare i germi come col processo di diluzione nella gelatina, distesa quindi sulle lastre di vetro, e ciò per due ragioni: anzitutto per ciò che col primo metodo non si usufruisce che di una parte soltanto della gelatina, di quella parte, cioè, che sta ad immediato contatto coi solchi d'innesto, mentre nel secondo una piccola porzione di materiale viene distribuito in una quantità di gelatina, relativamente molto grande, e riesce quindi più facile ottenere l'intento di fare sviluppare separati e distanti i singoli germi. In secondo luogo poi, nel disegnare le strie coll'ago di platino, la maggior parte del materiale si deposita sul punto che è primo toccato, ove per lo più i microbi si sviluppano addossati gli uni cogli altri. Sicchè, specialmente quando si tratta di sostanze che contengono un gran numero di germi, sarà sempre preferibile il metodo delle diluzioni nella gelatina.

Volendo adoperare in luogo della gelatina l'agar-agar, bisogna usare molte avvertenze, giacchè questa sostanza fonde ad una temperatura piuttosto elevata e al disotto di 40° C. non è più liquida. Si fa liquefare perciò a bagno maria a 42-43° C., si fa l'innesto e si rimescola, come al solito, mantenendo il tubo entro l'acqua calda ad una temperatura che oscilli fra 40-42° C., e si versa quindi rapidamente sulla lastra di vetro.

Ho già accennato ai vantaggi che offre l'agar-agar sulla gelatina ordinaria, che sono principalmente di permettere anche lo sviluppo di quei microparassiti pei quali è necessaria la temperatura del corpo, e di non essere fluidificata da quelle specie che fluidificano la gelatina. Di fronte a questi vantaggi avvi soltanto l'inconveniente, che lo sviluppo di certi microrganismi nell'agar-agar è più lento, e che alcuni anzi non vi crescono affatto.

Siero del sangue.

Un'altra sostanza di nutrizione *solida* e *trasparente*, che è forse la più adatta per lo sviluppo dei microrganismi patogeni, è il *siero del sangue, sterilizzato* e *solidificato* ad una temperatura un po' inferiore a quella che corrisponde al punto di coagulazione completa di questa sostanza.

Fu il Koch (1) che scoperse per primo la particolare proprietà del siero sanguigno, di mantenere inalterata la sua trasparenza quando si faccia coagulare lentamente ad una data temperatura; ed egli la pose subito a profitto per preparare un substrato di nutrizione, assai omogeneo per le condizioni che richiede lo sviluppo dei microparassiti.

Sono necessarie anzitutto alcune cautele nel raccogliere il siero del sangue dall'animale. Si preparano a tal uopo alcuni recipienti cilindrici capaci di 1 $^1/_2$ - 2 litri, alti circa tre volte tanto che larghi (ad es., 60 cm. di altezza per 20 di larghezza) e muniti di relativo coperchio di vetro. Questi vasi si puliscono accuratamente, si sciacquano con una soluzione di sublimato a 1 $^0/_{00}$, per uccidere i germi che vi possono essere ancora aderenti, e si lavano quindi coll'alcool per togliere qualsiasi traccia di sublimato, lasciandoli asciugare finalmente a moderato calore. Il coperchio si chiude all'intorno con paraffina o con vaselina.

Si tagliano i peli dell'animale sul luogo che dev'essere ferito e si pulisce accuratamente; bisogna anche raccomandare a chi fa il taglio di incidere i vasi senza ledere la trachèa, ed il primo zampillo di sangue che spiccia, il quale può contenere peli tagliati e particelle di sudiciume della pelle, non si raccoglie. Si riempiono i vasi fino al margine, si chiudono col coperchio, e se si ha la comodità sul luogo, si pongono immediatamente in una ghiacciaia; poichè quando la coagulazione del sangue è

---

(1) Koch, *Die Aetiologie der Tuberculose.* Berl. klin. Wochenschr. 1882, No. 15; e Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. II, 1884, p. 47.

incominciata, il vaso non si deve più muovere, per evitare che si disturbi la formazione d'un coagulo compatto e che si mescoli col siero una certa quantità di corpuscoli rossi. Ma se invece si raccoglie il sangue in un pubblico macello e si deve poi trasportare nei laboratori, come è il caso più ordinario, si lascia fermo il vaso sul luogo, subito dopo che è stato riempito di sangue, per un tempo variabile da 10 minuti a $^1/_2$ ora; quando si è formato il coagulo, si porta nella ghiacciaia o in luogo freddo, ove si fa depositare senza toccarlo

il sangue di agnello per 1 giorno,
quello di vitello per 2 giorni.

La focaccia fibrinosa del sangue spreme fuori dalle sue maglie il siero da ogni parte in senso centrifugo, e al disopra della stessa si raccoglie uno strato di liquido perfettamente limpido, di un colore giallo di succino. Se non ha questo colore ed è rossastro, segno è che contiene troppi corpuscoli rossi ed allora, quando si riscalda, perde la sua trasparenza. Il siero del sangue di vitello si separa più difficilmente di quello d'agnello o di montone, e spesso non si riesce ad ottenerlo trasparente e adatto per lo scopo a cui deve servire.

Questo siero limpido si aspira cautamente e senza agitarlo in una pipetta sterilizzata e si mette nei tubi da saggio, sterilizzati come d'ordinario, fino a $^1/_3$ circa dell'altezza, chiudendoli quindi subito coll'ovatta. Si devono usare tutte queste minute precauzioni nel raccogliere il siero del sangue, nell'intento che vi si mescoli il minor numero possibile d'impurità, giacchè la sterilizzazione di questo liquido non si può fare, come quella della gelatina, nel vapor d'acqua a temperatura elevata, ma bisogna farla in maniera discontinua, usando il metodo proposto per la prima volta dal Tyndall per ottenere la sterilizzazione dell'infuso di fieno.

Le regole necessarie per *sterilizzare* e *solidificare* il siero sanguigno sono state già esposte a riguardo degli apparecchi a ciò destinati, e non è necessario ripeterle. Aggiungerò soltanto che alla superficie del siero liquido sterilizzato si forma spesso una pellicola di colesterina, la quale non dev' essere

scambiata con colonie di microbi, e che durante la solidificazione dello stesso il vapore acqueo si condensa sulla parete superiore del tubo e cade quindi e si raccoglie nel fondo, formando colle sostanze solubili un liquido di nutrizione molto adatto allo sviluppo dei microrganismi. In tal modo si ha il vantaggio di potere osservare lo sviluppo di questi, innestati nel siero, contemporaneamente in un substrato solido ed in un liquido e di constatarne le differenze.

Attraverso il piumacciolo d'ovatta che chiude i tubi succede sempre una perdita d'acqua per evaporazione, cosicchè il siero solidificato a poco a poco si dissecca; cionostante la parte mediana e l'inferiore si mantengono anche per qualche mese adatte per lo sviluppo dei microrganismi.

Se la sterilizzazione del siero non è riuscita, lo si può già rilevare pochi giorni dopo che si è solidificato, specialmente se si tiene a titolo di prova entro la stufa a 28-30° C. di temperatura. Si vedono comparire in tal caso un certo numero di punticini biancastri che aumentano di volume, confluiscono e talora fluidificano anche il siero del sangue; coll'osservazione microscopica si trova che per lo più si tratta di bacilli, provenienti da spore che hanno germogliato più tardi. Naturalmente si adopereranno per le culture soltanto quei tubi i quali, dopo essere stati parecchi giorni nella stufa, si sono mantenuti perfettamente chiari e trasparenti.

Il Löffler (1) ha osservato che si può diluire il siero sanguigno con altre soluzioni nutritive, senza che perda la sua proprietà fondamentale di coagulare mantenendosi trasparente, col vantaggio anzi di costituire un terreno di nutrizione maggiormente adatto per lo sviluppo di certi microparassiti. Il Löffler consiglia un miscuglio di 3 parti di siero sanguigno ed 1 parte d'infuso o di brodo di carne di vitello, preparato come si è detto, a cui si aggiunge

1 % di peptone secco,
1 % di zucchero d'uva,
½ % di sal di cucina.

Si cuoce dapprima l'infuso di carne, a cui si sono aggiunti questi ingredienti, si neutralizza colla soluzione di carbonato di soda, si cuoce di nuovo a bagno maria finchè si è precipitata tutta l'albumina e si filtra. Si sterilizza nell'apparecchio a vapor d'acqua, si lascia raffreddare e vi si aggiunge il siero. Questo miscuglio di siero e di brodo (*Fleischinfus-Pepton-Zucker-Serum*) si sterilizza a 58° come il siero puro e si fa solidificare egualmente.

Per potere osservare col microscopio a debole ingrandimento le culture nette ottenute sul siero sanguigno, si fa solidificare questo in piccole scatole di

(1) Löffler, *Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphterie*, etc. Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. II, p. 452 e 461.

vetro (*Dosen*), foggiate a guisa delle grosse campane che servono da camere umide, ossia formate da due scatolette circolari, una delle quali rientra nell'altra e viene in tal modo, fino ad un certo punto, protetta dalle impurità dell'aria. Queste scatole si dispongono poi come i portoggetti colla gelatina entro le campane, e si pongono nelle stufe.

Per fare gl'innesti nei tubi da saggio contenenti il siero solidificato, si procede nell'istessa maniera già descritta per l'innesto in gelatina, colla sola differenza che invece d'immergere l'ago di platino nello spessore della sostanza (come si usa per la gelatina), si striscia sulla superficie solida del siero stesso.

Questo materiale di nutrizione non serve, come la gelatina e l'agar-agar, per ottenere l'isolamento di molti germi che si trovano riuniti, perchè non si può fluidificare e distendere in grande superficie; si deve usare perciò un materiale d'innesto puro, o che contenga soltanto un piccolo numero di germi, e fare gl'innesti in molti tubi contemporaneamente. Di fronte però a coteste difficoltà, di semplice tecnica, sta il vantaggio incontestabile che il siero è il substrato più adatto d'ogni altro per lo sviluppo dei microparassiti, specialmente perchè si può mantenere alla temperatura del corpo. Non bisogna dimenticare infatti che il Kock è riuscito ad ottenere in cultura isolata i bacilli tubercolari, soltanto coll'uso di questo materiale di nutrizione.

Con questo termina tutto quanto si riferisce alle sostanze di nutrizione ed al modo di usarle per ottenere le culture isolate col metodo del Koch, le cui particolarità possono in breve venire riassunte colle stesse parole di quest'illustre scienziato. « La specialità del metodo presente consiste in ciò, che si adoperano mezzi di nutrizione solidi e possibilmente anche trasparenti, che questi sono vari e si scelgono adatti alle singole specie di microbi che si vogliono coltivare, che diventano superflue tutte le cautele rigorose destinate ad impedire l'ingresso di germi stranieri, che le coltivazioni ulteriori si fanno sotto forma di un gran numero di culture isolate, delle quali soltanto quelle che rimangono pure servono per proseguire le coltivazioni stesse, e che finalmente si può e si deve anzi esercitare di continuo col microscopio il controllo delle proprietà di ciascuna colonia ».

Culture nei portoggetti incavati.

Come appendice al metodo del Koch bisogna accennare infine alle culture fatte nei liquidi nutritivi, ridotti però a forma

di goccie, in modo da potere controllare col microscopio quandosivoglia lo sviluppo dei microrganismi che vi si innestano; giacchè questo processo serve bene per lo studio di certe proprietà biologiche dei microrganismi, permettendo di osservarli nello stato di vita naturale e coi più forti ingrandimenti.

Si è già accennato, parlando degli strumenti e degli oggetti che si adoprano per queste ricerche, alle cosidette « camere » per la coltivazione dei microbi da osservarsi direttamente al microscopio; e si è pur detto che ne sono state proposte molte forme, ma che la più semplice di tutte, sufficiente per le ricerche ordinarie, è quella costituita da un portoggetti che abbia nel centro un'escavazione, profonda qualche millimetro, larga 1-1 $^1/_2$ cm. e coperta da un vetrino. Si prende uno di questi portoggetti, si spalmano i margini dell'incavo centrale con vaselina, e si deposita nel mezzo di un coproggetti, ben pulito e sterilizzato sulla fiamma, una piccola gocciolina, grossa come un grano di miglio o come una lenticchia, di un liquido nutritivo. Il liquido che serve meglio per la maggior parte dei microparassiti è il brodo neutralizzato e sterilizzato; lo si prepara colle stesse regole esposte per la gelatina, neutralizzandolo senza aggiungervi altro, nè gelatina nè peptone. In quella piccola goccia si mescola coll'ago di platino una minima quantità di materiale e si rovescia subito il vetrino, applicandolo sull'incavo del portoggetti, in modo che la goccia si trovi nel mezzo dello stesso senza toccarne il fondo nè i margini. Si deve sempre preparare così collo stesso materiale un certo numero di portoggetti.

Nel giorno seguente si fa l'osservazione microscopica, usando l'immersione ad olio, un diaframma stretto ed un oculare debole; esaminando i margini della gocciola, si vede in tal guisa se i microbi che si studiano sono mobili o no, e si vede anche come si dispongono sia nel centro che nei margini della gocciola stessa. Dopo averli bene osservati nello stato di vita e senza l'aiuto di reagenti, si distacca il vetrino e si fa evaporare il liquido senz'altro; oppure, se i microrganismi sono molto numerosi, si distribuiscono in 3-6 coproggetti, si colorano e si osservano di nuovo con forti ingrandimenti nell'acqua o nel balsamo.

Queste culture nei portoggetti incavati servono anche per istudiare l'azione del disseccamento sulla vitalità dei microparassiti. Si preparano difatti colle culture nette molti portoggetti nel modo anzidescritto, si tolgono quindi i vetrini e si lasciano disseccare: ad ogni quarto d'ora successivo si prende uno di questi vetrini, vi si aggiunge di nuovo una gocciolina di brodo e si torna a mettere sopra l'incavo del portoggetti, chiudendo l'ingresso all'aria per mezzo della vaselina. Dopo un certo tempo, dopo 24 ore circa, si osservano tutte le culture al microscopio, e si vede in quali di queste i microrganismi hanno ripreso le loro proprietà vitali (accrescimento, mobilità) e in quali invece hanno perduto la vita.

Questo metodo ha difatti servito recentemente per istudiare la resistenza al disseccamento del microparassita colerigeno.

Invece del brodo si possono usare anche altri liquidi, e questi si adoperano anche per avere culture in massa, quando si abbia a disposizione un materiale allo stato di purezza. Uno dei liquidi molto adoperati è il *latte*, il quale si ottiene sterilizzato in due maniere: esponendolo per 35 minuti alla corrente di vapor d'acqua nell'apparecchio a vapore, oppure col metodo del riscaldamento discontinuo, come si usa pel siero del sangue, ossia mantenendolo a 65-70° C. per 1 ora, per 5-6 giorni di seguito.

Metodo dell'infezione negli animali.

Fra i metodi che servono per ottenere in cultura isolata una data specie di microparassiti avvi pur questo dell' infezione negli animali; metodo che si serve del substrato più acconcio, perchè è il più naturale, per lo sviluppo di questi esseri, valendosi della proprietà che hanno alcune specie di animali di offrire un terreno propizio per la riproduzione di certi microparassiti solamente.

È al Koch (1) che si deve pure la scoperta di questo fatto e

(1) Koch, *Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten*, Leipzig 1878.

la sua applicazione pratica, che è piena d'interesse; giacchè con ogni probabilità l'infruttuosità delle ricerche, in molte malattie che hanno evidentemente un carattere infettivo, è dovuta a lacune del metodo, al non essersi, cioè, ancora trovato il terreno adatto per la riproduzione di quei speciali microparassiti al difuori dell'organismo animale.

Il Koch ha osservato che, inoculando i liquidi putrefatti nei topi di campagna e nei topi bianchi, muoiono questi ultimi soltanto per una forma di setticemia causata da un bacillo specifico, e che per mezzo d'innesti successivi, fatti col sangue dei topi infetti in altri topi, si ottiene nel sangue di questi animali *una cultura netta* di quella specie di bacilli. Altrettanto si ottiene a riguardo del bacillo dell'edema maligno, inoculando nelle cavie la terra dei giardini; e così pure, inoculando ne' conigli i liquidi putrefatti, dopo alcuni innesti successivi si ottiene isolata nel sangue degli stessi un'altra specie di microrganismi, egualmente setticemici.

Con questo metodo inoltre si riesce ad ottenere isolata una certa specie di microparassiti, anche quando la stessa si sviluppa nell'organismo animale soltanto più rapidamente delle altre. Ognuno sa di fatti quanto facilmente i topi muoiono per innesto di carbonchio; orbene, se s'innesta in questi un miscuglio di microrganismi che contenga fra gli altri anche quelli carbonchiosi, si ottiene sicuramente dopo pochi innesti successivi una cultura netta di questi bacilli. Il Carter ed il Koch sono riusciti in tal guisa ad ottenere culture nette degli «spirocheti della febbre ricorrente» nel sangue delle scimmie.

Se un tal metodo si potesse applicare anche nella specie umana, si verrebbe a conoscere assai presto la causa di molte malattie evidentemente infettive, che ancora ci sfugge e che deve invece essere ricercata per altre vie, che sono più indirette ed in parte ancora da studiarsi, perfezionando i metodi di ricerca attuali.

Metodo del riscaldamento.

Debbo finalmente accennare ad un altro metodo, proposto da alcuni egualmente per le culture isolate, e che può anche essere utile in qualche caso, fondato sulla proprietà che ha ciascuna specie di microbi di resistere ad un grado diverso di temperatura.

Il Miquel, che ha fatto molti studi sul potere di resistenza delle spore pel calore, ha ottenuto isolato il « bacillus ureae » riscaldando a 108° C. l'acqua che ne conteneva le spore. Il Brefeld ed il Prazmowsky si sono pure serviti dello stesso mezzo per separare dalle altre alcune specie di bacilli sporigeni: ma recentemente il Gunning (1) ha proposto di valersi sistematicamente dell'azione della temperatura elevata, per ottenere separate le varie specie di microbi.

Evidentemente un tal metodo non acquisterà mai un valore generale, giacchè può servire soltanto a separare i microbi senza spore da quelli che ne contengono. Avendo però a nostra disposizione altri processi assai più comodi e più sicuri, l'importanza del riscaldamento, anche per lo scopo anzidetto, rimarrà sempre limitata a pochi casi; poichè, dato pure che si conosca esattamente il grado massimo di calore a cui resiste una data specie che si vorrebbe isolare, riscaldando il mezzo che la contiene fino quasi a quel punto, si uccideranno i germi che sono meno resistenti, ma non quelli che hanno pel calore un grado di resistenza eguale, od anche maggiore di quello offerto da quel dato microrganismo. Ho voluto accennare tuttavia anche a questo metodo, sia perchè è stato proposto come metodo generale, sia perchè si può anche adoperare in certe circostanze, quando si è sicuri che non esistono nella miscela altre specie, che sieno egualmente o più resistenti al calore di quella che si vuole isolare.

(1) GUNNING, *Beiträge zur hygienischen Untersuchung des Wasser*, Archiv für Hygiene, Bd. I, 1883.

CAPITOLO VII

Trasmissibilità dei microrganismi patogeni

Innesti — Autopsie.

Fin qui si è parlato dei metodi che servono per dimostrare la presenza dei microparassiti nell'organismo animale e per coltivarli al difuori di questo: ma quando siffatte ricerche sono state coronate da successo e si sono trovati gli elementi parassitari caratteristici della malattia, rimane ancora la parte più difficile e più decisiva d'altronde per stabilire l'eziologia di un morbo infettivo, la dimostrazione, cioè, delle proprietà *patogeniche* ed *infettanti* di quella certa specie di microrganismi.

Ho detto proprietà patogeniche ed infettanti, poichè le due espressioni non si equivalgono, ma corrispondono piuttosto a due concetti diversi. Difatti può un microparassita essere capace di penetrare nell'organismo e renderlo ammalato, e tuttavia non essere trasmissibile direttamente da un individuo ad un altro: sicchè quando si è dimostrato il potere patogenico, resta ancora da provare se il parassita è o non trasmissibile agli individui della stessa specie o di specie diversa. Il fine adunque a cui mira lo esperimento negli animali è duplice: anzitutto si deve ricercare se quella specie di microbi è patogena, o no, ossia se è da considerarsi come la causa oppure come un elemento accessorio della malattia; in secondo luogo poi dobbiamo negli animali cercare di riprodurre l'infezione

nello stesso modo e per la stessa via, che si ritiene percorsa dall'agente infettivo nel produrre la malattia primitiva. Per far ciò lo sperimentatore deve in ogni caso cercare di attenersi, per quanto è possibile, alla regola generale che *l'esperimento si faccia nelle condizioni più prossime a quelle naturali*; giacchè per la riuscita dello stesso ha un'influenza notevolissima non solo la specie animale che si adopera, ma anche il modo e la via per la quale si pratica la trasmissione. Diremo in breve qualche cosa su di ciò, prima di esporre i vari modi di praticare gli innesti negli animali.

Scelta degli animali.

A questo riguardo regola generale si è di prendere anzitutto individui appartenenti alla stessa specie di cui fa parte l'animale, nel quale si è primitivamente sviluppata la malattia; se questo non è possibile, come nel caso di morbo infettivo della specie umana, si sceglieranno gli animali che sono immediatamente affini. Per le malattie dell'uomo bisogna provare adunque anzitutto nelle scimmie: ed il Koch è riuscito infatti a riprodurre la febbre ricorrente in questi animali, inoculando loro il parassita caratteristico.

Ma le ricerche non devono rimanere limitate agli individui della stessa specie o di quelle affini, *ma deve estendersi anche alle altre specie animali;* ed anzi questa seconda parte delle ricerche è di grande interesse per l'igiene, poichè serve per iscoprire le possibilità di diffusione della malattia infettiva. Del resto le prove di infezione sui vari animali sono anche importanti da un altro punto di vista, dal punto di vista, cioè, dell'attenuazione del potere patogenico che subiscono alcuni microparassiti, fatti sviluppare per un certo numero di generazioni successive nell'organismo animale.

Si è già visto quale e quanta differenza vi sia nell'intensità del potere patogenico, che esercita uno stesso microparassita sugli animali, secondo la *specie* ed anche secondo la *varietà* degli stessi, secondo l'*età* e secondo le condizioni dell'innesto (V. Cap. I).

La scelta degli animali ha adunque una grande importanza, giacchè si può cadere in errori grossolani, se si usano indifferentemente animali di specie diversa, oppure animali della stessa specie, ma di età differente. Bisogna andare perciò molto cauti, prima di giudicare della immunità che acquisterebbero artificialmente alcuni animali per certe malattie; e volendo fare confronti, si devono sempre adoperare individui eguali in tutto, anche nell'età.

Località e modo di fare gl'innesti.

Altrettanto importante che la scelta degli animali è quella della località dove praticare lo innesto e la maniera di eseguirlo. Ho già detto che si deve per l'infezione artificiale tenere la stessa via che si sa, o che si suppone, essere stata seguita dal virus infettante per produrre la malattia naturale; e quando questa non sia nota, bisogna tentare successivamente tutte le strade, cambiando ad ogni volta le condizioni dello esperimento.

Non è più il caso di ripetere quanto già si è detto a riguardo della *disposizione locale* e del diverso modo di reagire dell'organismo allo stesso virus, inoculato in luoghi diversi. Debbo aggiungere soltanto che una grande influenza esercita pure la *quantità* del materiale che si innesta, e che in generale non se ne deve introdurre una quantità troppo grande, per evitare la possibilità di un'azione concomitante di sostanze chimiche solubili, velenose, che talora si formano per opera dello scambio materiale dei microrganismi, e che potrebbero benissimo produrre un avvelenamento, invece dell'infezione che si vuole ottenere. Ciononostante in certi casi basta una piccolissima quantità, ed in altri invece è necessaria la introduzione di un gran numero di microbi per produrre la infezione. Un'altra avvertenza, pure indispensabile, è quella di ripetere le esperienze in un gran numero di animali e di farne sempre altre *di controllo*, innestando in una lunga serie di animali, da uno all'altro successivamente, i prodotti patologici (sangue, pus) degli animali morti in precedenza e le culture ottenute da questi stessi prodotti.

Si deve adunque escludere in ogni caso la possibilità di una morte accidentale, ripetendo l'esperimento in molti animali, e dichiarare *infettante* un dato virus, solamente quando sia stato ino-

culato in quantità così piccola, che la sua riproduzione ed il suo accrescimento nell'organismo animale sia posto fuori di dubbio.

I modi principali di fare gli innesti sono i seguenti:

Innesto cutaneo.

In questo si applica il materiale infettivo sulla pelle *privata dell'epidermide*, senza che la lesione arrivi al tessuto sottocutaneo. È questo il caso in cui si ha *l'innesto* nel vero e proprio significato della parola; ma ora l'uso della stessa si è esteso a significare *l'introduzione di virus nell'organismo animale, fatta in qualsivoglia maniera.*

Questa specie d'innesto si pratica sulla pelle e sulla cornea. Nel primo caso si radono i peli, si lava bene colla soluzione di sublimato e quindi con alcool il punto in cui si vuol fare l'o-operazione, si fa con un coltello sterilizzato una piccola incisione superficiale, in modo da non oltrepassare lo spessore del derma e senza che sangue fuoresca, e vi si applica il materiale che contiene i microrganismi.

Riguardo al punto di pelle ove fare lo innesto, in generale si deve scegliere una parte dove l'animale non giunga a leccarsi, ma che in pari tempo sia facilmente accessibile all'osservazione. Il miglior sito nei conigli, ed anche nelle cavie, è la superficie interna dell'orecchio vicino alla base. Si netta la cute nel modo suesposto, si praticano 2 o 3 ferite lineari, superficiali e parallele e si inquinano colla sostanza infetta. Nei topi si riesce invece difficilmente a limitare la lesione alla cute soltanto.

Nella cornea si opera egualmente, esportando con un bistori una porzione di epitelio ed applicandovi il materiale da innesto: se i microbi si sviluppano, si vedono penetrare nello spessore della cornea con figure di stella. Si può anche, ed è forse meglio, fare lo innesto pungendo la cornea con un ago da vaccinazione, bagnato nel materiale infettante.

È da osservare che l'innesto semplicemente cutaneo non

offre una garanzia assoluta contro un possibile inquinamento con altri germi, rimanendo le lesioni di continuo a contatto dell'aria e sottoposte perciò all'influenza degli agenti esterni.

Innesto sottocutaneo.

Questa forma d'innesto è più comunemente usata e si può fare in due maniere. Si può anzitutto radere i peli in una data regione, pulita colla soluzione di sublimato e coll'alcool, prendere con una pinza una piega della pelle e farvi con una sonda smussa o colla punta di un coltello una specie di saccoccia, scollando per un certo tratto la cute dai tessuti sottostanti. In questa saccoccia si introduce il materiale infettante, preso colla punta del bistori o coll'ago di platino sterilizzato. Nei topi si pratica quasi sempre l'innesto sottocutaneo, scavando la tasca nella cute del dorso alla radice della coda. — Per praticare la saccoccia sottocutanea ed introdurvi entro il materiale, senza pericolo di toccare la pelle ed i peli vicini, serve bene uno strumento semplicissimo, che viene usato nel laboratorio di anatomia patologica di Torino. È composto da due aste metalliche acuminate, divaricabili fra di loro a mo'di compasso: quando queste sono ravvicinate, costituiscono un ago, che sterilizzato alla fiamma serve a perforare la cute ed a scollarla dai tessuti sottostanti; e se invece si divaricano, si può sulla guida delle stesse introdurre l'ansa di platino col materiale infettante.

La seconda maniera di fare questo innesto è l'*iniezione sottocutanea*, fatta per mezzo della siringa Pravaz, modificata dal Koch. Si sterilizza la siringa, si stempera nell'acqua distillata e sterilizzata il materiale che si vuole innestare e si inietta sotto la pelle dell'animale. Questo secondo modo è forse migliore del primo, perchè esclude qualsiasi possibilità di inquinamento dallo esterno. Anche in questo caso si deve, come al solito, tagliare i peli e lavare la località con liquidi disinfettanti.

Si può anche fare con vantaggio l'innesto nella *camera ante-*

riore dell'occhio, specialmente quando si tratta di forme di microrganismi che si sviluppano lentamente; giacchè si può così osservarne gli effetti sull'iride, quando è già scomparso qualsiasi residuo di reazione infiammatoria. La tecnica per l'innesto nella camera oculare anteriore è uguale press' a poco a quella dell'iridectomia. Si afferra con una pinza una plica della congiuntiva e si tira il bulbo da una parte; si penetra con un bistori lanceolato nell'interno della camera anteriore, passando pel limite corneale, se ne volge la punta verso la cornea e si ritira fuori; avendo quest'avvertenza si evita che, fuoruscito l'umore acqueo, l'iride e il cristallino vengano lesi dalla punta del bistori. Il materiale s'introduce colla punta del coltello stesso, se si tratta di culture isolate, oppure con una pinza iridea, quando si vuole introdurre piccoli pezzetti di tessuti contenenti microbi. Questo metodo serve assai bene per ottenere le culture dei bacilli della tubercolosi, i quali si sviluppano assai tardi e sono perciò per lo più vinti dalla concorrenza di altre forme di microrganismi, coi quali si trovano uniti accidentalmente o in causa di altri processi morbosi, che decorrono talora paralleli alla tubercolosi.

Innesto nelle cavità sierose.

Non v'ha nulla di speciale nella manualità di questo innesto, il quale si deve compiere colle stesse avvertenze indicate per l'iniezione sottocutanea. Si radono i peli nelle regioni laterali del torace (cavo pleurico) o in quella dell'addome (cavo peritoneale), si disinfetta, e quindi colla siringa, previamente sterilizzata e riempita del materiale da iniettare, si caccia dentro le cavità sierose il quantitativo di liquido che si desidera. Per eseguire quest'operazione basta semplicemente tener disteso l'addome dell'animale, messo in posizione supina, ed infiggere dentro obliquamente l'ago della siringa, finchè si sente che cessa ogni resistenza: a questo punto si è sicuri di essere penetrati in cavità, senza aver leso l'intestino; si spinge allora con cautela l'ago un

poco più addentro, parallelamente alle pareti dell'addome, e si inietta il liquido.

Si può anche fare una piccola apertura nelle pareti addominali, introdurre direttamente nel cavo peritoneale il materiale da innesto coll'ago sterilizzato e quindi ricucire, coprendo la ferita con collodion misto a iodoformio.

Iniezione intravenosa.

Si pone allo scoperto il vaso sanguigno, che per lo più è la vena giugulare o la crurale, con tutte le cautele antisettiche, si fanno passare al disotto della stessa due fili, distanti 2-3 cm. circa l'uno dall'altro, per fare le legature necessarie, e quindi s'introduce l'ago della siringa entro la vena, nello spazio situato fra i due fili; si lega il vaso attorno all'ago-cannula col filo situato verso la periferia, per impedire che fuoresca il sangue, e si spinge dentro il liquido cautamente, a poco a poco. Bisogna far bene attenzione a che il liquido non contenga alcuna bollicina d'aria, essendo noto che l'introduzione di questa nell'albero venoso produce la morte immediata dell'animale. Fatta l'iniezione, si chiude coll'altro filo l'estremità centrale del vaso, si ritira la cannula, si lega anche l'estremità periferica della vena e si cuce la ferita come d'ordinario.

L'operazione dell'introdurre l'ago nella vena e di chiudere col filo l'uscita del sangue dev'essere fatta colla massima sollecitudine, per prevenire possibilmente la coagulazione del liquido sanguigno che viene a contatto dell'ago, e quindi la chiusura del lume di questo. Per ovviare a tale inconveniente, che compromette spesso l'esito dell'operazione, io uso introdurre prima l'ago-cannula, distaccato dal corpo della siringa, con entrovi il filo metallico che impedisce l'ingresso del sangue; fatta la prima legatura, ritiro il filo metallico, innesto la siringa, appena vedo il sangue venir fuori dall'estremità esterna della cannula, e spingo dentro il liquido immediatamente. Con tutto ciò l'iniezione intravenosa, specialmente nelle cavie che hanno le pareti dei vasi molto sottili, riesce spesso abbastanza difficile ad eseguirsi colle dovute cautele.

Se si tratta di iniettare il materiale di culture isolate, si stempera questo nell'acqua distillata e sterilizzata come di solito; se invece si vuol fare l'innesto del sangue da un animale in un altro, si raccoglie il sangue in un recipiente colle solite precauzioni, si diluisce con acqua sterilizzata e si inietta immediatamente.

Circa alla quantità di materiale che si deve iniettare, ossia circa al grado di diluzione ed al numero di goccie di liquido necessarie per produrre l'infezione, non si può dare alcuna regola generale: è necessario perciò in ogni caso stabilire con esperienze ripetute il « minimum » di materiale virulento, che è atto ancora a produrre l'infezione.

Infezione artificiale per la via degli organi digerenti.

Il mezzo di introdurre nell'organismo animale il materiale infettante, misto al cibo, per la via degli organi digerenti è uno di quelli che dev'essere messo in uso più di frequente, se si vuol rintracciare la via naturale che ha percorso il parassita per penetrare nell'organismo. È difatti l'apparecchio digerente una delle parti del corpo che ha commercio più diretto col mondo esterno, ed i cibi e le bevande possono servire da veicolo ai germi di molte malattie.

Questo modo di inoculazione artificiale dei virus infettanti va inteso nel senso, che venga esclusa nel farlo la possibilità di una lesione di continuo nel rivestimento epiteliale, che tappezza la superficie del canale digerente, altrimenti si avrebbe il caso di un semplice innesto intra- o sotto-mucoso, secondo la profondità della lesione. Prima condizione adunque nell'eseguirlo si è di usare cibi di tal natura, che non possano produrre lesioni della mucosa, per quanto però riesca impossibile di escludere in modo assoluto l'esistenza delle stesse. Si usa perciò di mescolare le culture dei microbi con sostanze liquide (acqua, brodo, latte), le quali vengono ingoiate senza previa masticazione e non possono produrre alterazione alcuna della mucosa. Per gli

animali grandi si può, come hanno fatto Koch, Gaffky e Löffler per produrre l'infezione carbonchiosa, prendere un cubo di patata fresca, tagliarvi una fetta a mo' di coperchio, fare un incavo nel cubo e porvi dentro il materiale infettante. Il pezzo di patata così preparato si spinge entro la bocca dell'animale fino alla radice della lingua, in guisa che venga ingoiato senza masticazione. Si possono preparare egualmente cubetti di albumina coagulata.

Le ricerche fatte finora con un tal metodo ne insegnano che i bacilli senza spore vengono uccisi dall'acidità del succo gastrico, e che invece le spore resistono e possono produrre l'infezione. Bisogna adunque, quando ne sia il caso, fare contemporaneamente le esperienze coi bacilli contenenti spore e con quelli privi di spore; e quando i microbi non sono sporigeni, si produrranno artificialmente quelle condizioni le quali, ostacolando l'azione del succo gastrico acido, facilitano l'infezione.

Così si può produrre un catarro gastro-enterico acuto, propinando i drastici, oppure fare l'iniezione nel duodeno, come hanno fatto Nicati e Rietsch (1) per l'inoculazione dei microbi colerigeni. Per fare quest'operazione si lega l'animale, si tagliano i peli nella regione addominale e si disinfetta. Si copre il ventre dell'animale con un pezzo di carta cautschuc, che abbia un'apertura corrispondente alla lunghezza della linea alba, si incide la parete dell'addome lungo questa linea, si cerca rapidamente l'estremità pilorica dello stomaco e si segue lungo l'omento fino al duodeno, entro il quale si inietta finalmente il materiale colla siringa Pravaz. Si ricuce l'addome e si medica la ferita con collodion e iodoformio. Inutile quasi che ripeta che gli strumenti, il filo, ecc., devono tutti essere accuratamente sterilizzati.

Infezione artificiale per le vie respiratorie.

Anche l'introdurre il virus per mezzo dell'inalazione sarebbe uno dei modi di esperimento che più si avvicinerebbe alle condizioni naturali, in cui si ritiene almeno che avvenga l'infezione in molti casi di malattia. Disgraziatamente però i metodi che si usano per tale oggetto sono molto imperfetti, e non se ne conosce ancora alcuno che offra guarentigie sicure contro la possibilità che l'infezione avvenga per un'altra strada.

---

(1) Nicati e Rietsch, Semaine médicale, 1884, No. 38.

Difatti l'inalazione *attraverso la fistola tracheale* non esclude la possibilità dell'infezione per la ferita della trachea; nell'inalazione *attraverso la bocca ed il naso* può il materiale infettante essere in pari tempo deglutito; e finalmente anche nel terzo metodo, proposto dal Buchner, di tenere l'*animale immerso in un'atmosfera in cui si polverizza il liquido infetto*, non rimane esclusa la possibilità dell'infezione da una qualsiasi piccola lesione di continuo, che esista sulla superficie del corpo.

Autopsie.

Allorquando si è constatato che coll'innesto del materiale puro di cultura di certi microrganismi gli animali ammalano e muoiono, il nostro còmpito non è ancor terminato. Trattandosi di ricerche così delicate, non basta soltanto la prova, ma è necessaria anche la riprova; e questa si ottiene facendo sviluppare la stessa specie di microparassiti da un animale in un altro, per 3-4 generazioni consecutive, e trasportandoli da questi nei mezzi di nutrizione artificiali fino a che, osservando costantemente il riprodursi delle stesse proprietà biologiche, si può concludere con certezza che la causa delle alterazioni morbose è riposta realmente nello sviluppo di quella forma di microparassiti.

Per prendere il materiale per gli innesti e per le culture successive, è necessario sezionare il cadavere degli animali morti e fare in modo che nessuna impurità si aggiunga dall'esterno a turbare l'andamento dell'esperienze. Per ottenere ciò sono due le regole principali che si devono osservare. Anzitutto l'autopsia deve farsi immediatamente dopo la morte, e questo perchè nell'organismo animale privo di vita i microrganismi, contenuti nell'interno, si sviluppano subito con istraordinaria rapidità; e nel fare lo esperimento noi vogliamo invece conoscere il modo di diffusione e l'intensità dello sviluppo dei parassiti, quale è durante la vita. È noto inoltre con quanta rapidità avviene la putrefazione nei casi di malattie infettive, per cui è preferibile anzi, quando si

può, uccidere l'animale poco prima che muoia ed osservarne le alterazioni interne, come in appresso. — La seconda precauzione da prendersi, per evitare le impurità, è quella di adoperare strumenti accuratamente disinfettati. A tal uopo si sterilizzano sulla fiamma, o nella stufa a secco a 150° C., un certo numero di coltelli, forbici e pinze e si pongono sotto una campana di vetro, perchè si raffreddino al coperto dalla polvere.

L'animale si distende supino su di una tavoletta di legno, fissandolo su questa (quando si tratti di piccoli animali, cavie, topi e conigli) per le quattro estremità con altrettanti spilloni di acciaio. Si comincia dal tagliare i peli lungo tutta la linea mediana del corpo, ove dev' essere fatta l'incisione della cute, e si lava quindi accuratamente colla soluzione di sublimato: si incide la pelle con un bistori, se l'animale è grande, oppure si taglia colle forbici sollevandola colle pinze, se l' animale è piccolo, e si scolla dai due lati per avere un largo campo di operazione, privo della cute e delle impurità che vi sono aderenti. Nel proseguire la sezione, regola generale si è di *cambiare l'istrumento adoperato ad ogni nuova incisione che si deve fare.*

Questa precauzione è necessaria per evitare che germi estranei aderiscano al coltello nell'atto che si taglia la cute o gli strati superficiali, e si mescolino poi col materiale da coltivazione. Dopo avere tagliato la cute, si arroventano adunque sulla fiamma le pinze, il bistori e le forbici adoperate e si pongono a raffreddare sotto una campana, prendendone altri già sterilizzati.

Si comincia dall'aprire la cavità del torace, praticando nella gabbia toracica una finestra sufficientemente ampia, perchè sia posto allo scoperto il cuore e la superficie dei polmoni. Qui, se occorresse di esaminare il contenuto pleurale, se ne prende una piccola quantità coll'ansa di platino sterilizzata e si distende su tre portaoggetti, che si coprono e si lasciano disseccare, pronti così per l'ulteriore esame coi reattivi coloranti. Si possono fare ugualmente innesti nella gelatina, nel siero di agar e sulle patate alla maniera ordinaria. Nel caso speciale di tubercolosi polmonare, si taglia via un nodicino colle

forbici previamente arroventate, si schiaccia fra le lame di due coltelli e coll'ansa di platino si distende questa massa sul siero di sangue solidificato. Questo si fa quando si tratta di nodi miliari, i quali sono resistenti; ma quando il tubercolo è già caseificato, basta tagliarlo e prendere il materiale dal centro coll'ansa di platino. Per esaminare il succo polmonare, si dà un taglio al viscere colle solite avvertenze e se ne raccoglie il succo, raschiando la superficie di sezione colla lama del bistori o coll'ansa di platino sterilizzata.

Per esaminare il sangue del cuore si apre il pericardio, si afferra la punta del cuore con una pinza e si apre l'orecchietta destra, raccogliendo il sangue immediatamente coll'ansa di platino.

Colle stesse regole si procede quindi all'apertura della cavità dell'addome, facendo preparati microscopici col succo del fegato, della milza e del rene, preso colle cautele anzidescritte, ed esaminando anche il contenuto peritoneale, intestinale e quello della vescica, per osservare se accade la eliminazione degli elementi estranei parassitari per mezzo dell'apparecchio uropoietico. Inutile che ripeta che collo stesso materiale, ottenuto da questi vari organi (specialmente col succo della milza), devono farsi anche le coltivazioni di controllo. Trattandosi di organi molli, si può anche estrarne il contenuto afferrandoli con due pinze sterilizzate e tirando fino a stracciarli, per prendere poi coll'ansa di platino il succo dall'interno, che non è stato così toccato da nessuno istrumento.

Non ho bisogno di insistere ulteriormente sul modo di esaminare gli altri organi e tessuti dell'organismo: mi basti soltanto di aggiungere che non deve mai essere trascurato l'esame di nessun organo, se si vuole acquistare una nozione esatta e completa del modo di distribuzione dei microparassiti nell'interno degli stessi.

Finalmente di ciascun viscere si prenderà un pezzo e si farà indurire nell'alcool assoluto, per poterne fare sezioni e prepararle per l'esame coi mezzi di colorazione più adatti.

Quando si tratta di trarre il materiale per le culture da organi, che sono stati estratti dal cadavere già da qualche tempo, si può, come consiglia il Gaffky (1), dopo avere lavato il viscere colla soluzione di sublimato, fare una grande incisione longitudinale che comprenda la totalità del viscere stesso; si fa quindi con un secondo coltello un'altra incisione in direzione perpendicolare sulla nuova superficie di sezione, senza giungere però fino alla periferia, e finalmente se ne fa una terza nello stesso modo, per prendere da quest'ultima superficie di taglio il materiale per le osservazioni e per le culture.

Questo però si può fare soltanto quando l'organo ha una certa grandezza. Ordinariamente, come consiglia il Löffler (2), è preferibile tenere immerso il viscere in una soluzione di acido fenico al 5 % per 5 minuti, per uccidere i microbi che si trovano alla superficie, tenerlo quindi per altrettanto tempo nella soluzione di sublimato all'1 % per uccidere le spore, se ve ne sono, e finalmente, dopo averlo bene asciugato con carta bibula, tagliarne dalla superficie verso l'interno una serie di sezioni, cambiando il coltello per ciascuna di queste, finchè si è giunti nel centro dell'organo, donde si prende il materiale nella maniera anzidetta; oppure se ne stracciano via alcuni pezzi colle pinze arroventate, come già si è accennato.

(1) Gaffky, *Zur Aetiologie des Abdominaltyphus*. Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. II, p. 386.
(2) Löffler, Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. II, p. 451.

Come appendice a tutto quanto è stato esposto relativamente ai metodi di ricerca, aggiungiamo poche cose ancora sullo

Studio delle proprietà biologiche dei microparassiti,

che sono più interessanti a conoscersi per la pratica e per l'igiene acciò che sia possibile di applicare con profitto gli agenti destinati ad impedirne lo sviluppo e la diffusione (disinfettanti).

La prima cosa che si deve fare è, come si è detto, di provare la suscettibilità pei microparassiti in molti animali di specie diversa, per conoscere quali sono le possibilità di diffusione della malattia che si studia.

Viene in seguito la ricerca dei varii mezzi di nutrizione in cui è possibile lo sviluppo del parassita, e quella del modo suo di crescere in ciascun mezzo. E qui è interessante di conoscere se i microrganismi hanno proprietà *peptonizzanti*, ossia se sono atti a disciogliere ed a convertire in peptoni gli albuminati solidi, come sarebbero la caseina e la fibrina coagulata. A tal uopo si prendono alcuni fiocchi di fibrina o di caseina, precedentemente lavati con acqua sterilizzata, oppure alcuni dadi di albumina d'uovo coagulata e si pongono in altrettanti tubi da saggio con un poco di acqua sterilizzata. In alcuni tubi inoltre si pone, invece della semplice acqua, una soluzione di estratto di carne a 0,1 $^0/_0$ e di zucchero d'uva a 0,5 $^0/_0$.

Si innesta in questi tubi il materiale di cultura, e si tengono in parte alla temperatura dell'ambiente e in parte invece nelle stufe. Si possono anche fare innesti nel latte sterilizzato, per vedere se i microbi producono la coagulazione della caseina con formazione di acido, e se disciolgono poi la caseina precipitata.

Si deve anche ricercare se sviluppandosi producono sostanze che solubili, aventi le proprietà di *fermenti*, oppure se agiscono da fermenti gli stessi individui cellulari; osservando inoltre

se producono materie velenose alcaloidiformi (ptomaine), le quali possono dar luogo a fenomeni d'intossicazione senza che si abbia una vera infezione, ossia senza riproduzione nell'organismo degli elementi parassitari. Ma del modo di studiare cotesti prodotti non possiamo discorrere, essendo argomento troppo esteso e di dominio speciale della chimica fisiologica.

Per istudiare il modo di comportarsi dei microrganismi, ottenuti in culture isolate, verso la *temperatura*, si deve determinare anzitutto il grado più basso di calore a cui comincia lo sviluppo, poi quello che è più favorevole per lo accrescimento ed infine la temperatura in cui lo sviluppo stesso si sospende, senza che avvenga ancora la morte dei microbi. Si tiene perciò una parte dei tubi colle culture in una ghiacciaia, nella quale la temperatura oscilla d'ordinario fra + 5° e + 8° C.; una parte si pone in un vaso a parete doppia, dove si fa circolare continuamente l'acqua fredda, ottenendosi così una temperatura fra 8° e 15° C., oppure si tiene semplicemente alla temperatura dell'ambiente; e finalmente la terza parte dei tubi si colloca nei termostati ad una temperatura superiore a quella dell'ambiente stesso, da 15° fino a 37° C. (temperatura del sangue).

In questa guisa si determina il grado di calore nel quale si ha il massimo dello sviluppo e dell'azione fisiologica (*virulenza* nel caso nostro) dei microrganismi. Si innestano perciò con questi alcuni tubi con sostanze di nutrizione solide ed altri contenenti liquidi nutritivi sterilizzati, e si determina il tempo nel quale si manifestano sulle sostanze solide le colonie in modo appariscente: si prende in pari tempo dalle culture fatte nei liquidi un piccolo saggio di quando in quando, per osservare il momento in cui la cultura stessa ha raggiunto il massimo di virulenza per gli animali, oppure il massimo di azione sul mezzo (il grado di acidità ad es.) nel più breve spazio di tempo. Questo *grado* di calore *ottimo* per lo sviluppo delle singole specie oscilla sempre entro certi limiti, al di là dei quali l'accrescimento dei microbi diminuisce, finchè si arresta del tutto. È interessante pure di determinare questo *grado di arresto* dei fenomeni

vitali, e finalmente il grado di calore in cui si spegne anche la vita di questi esseri microscopici.

Nello studio dell'influenza della temperatura viene in seguito la ricerca della possibilità di un'*attenuazione* del potere patogenico, mantenendo le culture per un certo tempo ad un dato grado di temperatura piuttosto elevato. Si è già visto che un tale studio è stato fatto in larga scala pel bacillo carbonchioso.

Finalmente si deve ancora osservare, nelle specie provviste di spore, quale è il grado di temperatura più favorevole per la sporificazione, i limiti in cui questa è possibile e la temperatura in cui le spore si schiudono per riprodurre gli individui cellulari caratteristici. Tutte queste osservazioni si fanno nei tubi contenenti le varie sostanze di nutrizione, collocati nei termostati, oppure nelle « camerette umide da cultura » poste sul tavolo riscaldante di Schultze, sotto il controllo diretto del microscopio. La determinazione esatta dell'azione della temperatura sui fenomeni vitali dei microrganismi serve a stabilire il grado di adattamento degli stessi alle condizioni della vita parassitaria.

Per determinare la temperatura che serve ad *uccidere le spore*, si usa un bagno maria con acqua semplice, oppure con acqua salata o con olio per le temperature superiori ai 100° C. Il fondo del bagno è coperto da una tavoletta di legno, perchè i tubi non poggino direttamente sulla parete metallica riscaldata: il coperchio è provvisto di una serie di fori per collocarvi i termometri (a diversa profondità) e per introdurvi i tubi da saggio. — Il livello dell'acqua dev'essere superiore a quello del liquido entro i tubi. — Dopo una mezz'ora circa che questi sono nel bagno, ossia quando si può supporre che il contenuto degli stessi abbia raggiunto quella certa temperatura, si aprono, vi si introducono le spore agitando il liquido, si tengono ad una temperatura di 80°, 90°, 100° C. ed anche superiore, se è necessario, per un lasso di tempo variabile, e quindi si prova se le spore sono ancora capaci di svilupparsi o se invece sono morte. Per istabilire ciò, si mescola una parte di liquido colla gelatina o coll'agar-agar o col siero del sangue, e si mantengono queste so-

stanze a quel grado di temperatura che si sa essere più favorevole alla germinazione delle spore; oppure se ne fanno innesti negli animali, provando infine, come propone il Buchner, se le spore hanno acquistato la proprietà di colorarsi, il che è un indizio della perdita della loro vitalità.

L'influenza del *calore secco* si esperimenta bagnando alcuni pezzi di filo di seta nel materiale contenente i bacilli con le spore ed in quello senza spore: si fanno disseccare e si sottopongono, ponendoli nei vetrini da orologio, a diversi gradi di temperatura per un tempo variabile. Si prova quindi la vitalità dei microbi nei modi anzidetti.

L'influenza del *disseccamento semplice* si studia ponendo una goccia del liquido che contiene i microbi sopra un certo numero di vetrini coproggetti, e lasciandoli disseccare al coperto dalla polvere. Di giorno in giorno, o di ora in ora, si pone sopra lo straterello essiccato una goccia di liquido nutritivo sterilizzato, e si capovolge il vetrino sopra un portoggetti incavato, chiudendone i margini con paraffina o con vaselina, per impedire la evaporazione e l'ingresso alle impurità. Ponendo i microrganismi in condizioni favorevoli di temperatura, si vedono muoversi e svilupparsi di nuovo, quando sono ancora in vita, oppure nel caso contrario si constata col microscopio la cessazione dei fenomeni vitali. — I bacilli del carbonchio disseccandosi producono spore (esaurimento del materiale di nutrizione), le quali si mantengono vitali allo stato secco anche per mesi, mentre il vibrione colerigeno, che non produce le spore, muore assai presto per opera del disseccamento.

Rimarrebbe ancora a parlare del modo di stabilire il valore dei disinfettanti; ma a questo riguardo debbo limitarmi ad accennare che l'azione di siffatti mezzi, liquidi od aeriformi, deve essere provata tanto sulle forme vegetative ordinarie, quanto sulle forme durevoli (spore), quando ne è il caso: l'azione degli stessi si deve poi considerare realmente efficace, non quando si limita ad impedire o ad arrestare lo sviluppo dei microrganismi, ma soltanto allorchè serve a *distruggere la vitalità* dei bacilli e delle spore.

Se si tratta di liquidi, si preparano in soluzione, a diverso grado di concentrazione, entro un certo numero di bottigliette o di tubi di saggio, e vi si tengono immersi per un tempo variabile i fili di seta impregnati del materiale contenente i microrganismi (con e senza spore), fissati col disseccamento. Dopo un certo tempo si estraggono i fili con una pinza sterilizzata, si lavano con acqua egualmente sterilizzata e si pongono nella gelatina o negli altri mezzi di nutrizione, per vedere se i microbi sono ancora capaci di sviluppo. Per controllo si pongono contemporaneamente negli stessi mezzi di nutrizione altri fili impregnati nello stesso materiale, sui quali però non si è fatto agire il liquido in prova, ed altri lavati semplicemente coll'acqua sterilizzata. Si deve anche esercitare un altro genere di controllo, innestando sotto la cute degli animali i fili di seta su cui si è fatto agire il liquido disinfettante.

Se si tratta di provare l'azione disinfettante dei gaz, si usano egualmente i fili di seta contenenti il materiale coi microbi, ponendoli a contatto coi vari gaz nell' apparecchio usato dai D.ri Fischer e Proskauer (1), che consiste in una bottiglia di vetro, posta in comunicazione da una parte con un aspiratore e dall'altra colla sorgente di produzione del gaz.

---

(1) Fischer e Proskauer, *Ueber die Desinfection mit Chlor und Brom*, Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. II, 1884, p. 228.

CAPITOLO VIII

Descrizione biologica dei principali microrganismi patogeni

Bacillo del carbonchio.

È uno dei microparassiti primi scoperti, ed è forse quello che è stato studiato più completamente d'ogni altro sotto tutti i rapporti.

Scoperto nel 1850 da Rayer e Davaine ed osservato quindi dal Pollender (1) nel 1855, fu poi studiato da Brauell, da Davaine e da Bollinger, il quale distinse il vero carbonchio dal cosidetto « carbonchio sintomatico »: in seguito venne meglio conosciuto nelle sue proprietà morfologiche e fisiologiche per gli studi del Koch (2), del Pasteur (3) e di Buchner (4).

---

(1) POLLENDER, *Mikroskop. und mikroch. Untersuch. des Milzbrandblutes* 1855.

(2) KOCH, *Die Aetiologie der Milzbrand-krankheit, ecc.* Cohn's Beiträge Bd. II, 177, 1876.
— Lo stesso, *Zur Aetiologie d. Milzbrandes*, Mitth. a. d. kais. Ges. 1881.
— Lo stesso, *Ueber Milzbrandimpfung*. Kassel u. Berlin 1882.
— KOCH, GAFFKY e LÖFFLER, lavoro citato.

(3) PASTEUR, *Étude sur la maladie charbonneuse*. Compt. rend. 1877, t. 84, p. 400.
— Lo stesso, *Charbon et septicémie*, Compt. rend. 1877, t. 85.
— Lo stesso, *Sur la vaccination charbonneuse*, Compt. rend. 1883.
— Lo stesso, *La vaccination charbonneuse*. Reponse au doct. Koch. Revue scientifique. 20 jan. 1883.

(4) BUCHNER, *Versuche über d. Entstehung d. Milzbrandes d. Einathmung*, in Nägeli's Untersuch. über nied. Pilze. — Lo stesso, *Ueber die experim. Erzeugung d. Milzbrandcontagiums aus d. Heupilzen*, Ibid. — Lo stesso, *Die Umwandlung der Milzbrandbacterien in unschädliche Bacterien und die Entgegnung Koch's an Pasteur*. Virch. Arch. Bd. 91, 1883, p. 410-422.

I bastoncini del parassita, quali si osservano nel sangue di animali affetti da carbonchio (Tav. 2ª, fig. X e XI), hanno una lunghezza variabile da 5-20 μ, una larghezza di 1,0-1,25 μ e si moltiplicano per scissione trasversale. Accade spesso di vedere questi bacilli con una linea di segmentazione nel mezzo, che appare manifesta specialmente nei preparati che non sono stati esposti all'azione del calore; si vedono anche talora nello stesso punto i bacilli ripiegati ad angolo. La segmentazione dei bacilli carbonchiosi, che nei preparati tinti coi colori bruni di anilina appare evidente, sotto forma di linee chiare che dividono i bacilli o i loro filamenti in altrettanti segmenti, è una delle proprietà caratteristiche che serve a differenziarli da altre forme consimili.

Nel bacillo carbonchioso non sono stati finora osservati organi di movimento; ed è difatti realmente *immobile*, ossia sprovvisto di movimenti propri. Questa è pure una proprietà che lo distingue dal « bacillus subtilis », il quale invece è mobilissimo. Appartiene alla classe degli *aerobi* di Pasteur, ed è forse perciò che nell'organismo animale si sviluppa solamente entro i vasi, ossia in mezzo al sangue che è ricco di ossigeno, e non si trova mai nei muscoli o negli altri tessuti poveri di questo gaz. Probabilmente dallo stesso motivo dipende il fatto, che nella malattia prodotta da questo parassita manca qualsiasi traccia di processo infiammatorio nei tessuti. — Nel sangue si trova sotto forma di bastoncini o di filamenti, non però così lunghi come si hanno quando si coltiva il microbo artificialmente. — Nell'interno dell'organismo animale i bacilli non producono mai spore.

La temperatura più favorevole al suo sviluppo oscilla fra i 30-40° C.: al disotto di 15° e al disopra di 43° lo sviluppo si arresta, come quando manca l'ossigeno. Date le condizioni favorevoli, i bacilli crescono anzitutto in lunghi fili che si intrecciano fra di loro e possono raggiungere persino la lunghezza di cento bacilli uniti insieme. Dopo un certo tempo, variabile secondo il grado di temperatura, il contenuto cellulare, che prima era chiaro ed omogeneo, si fa granuloso; compaiono nell'interno dei filamenti alcuni corpicciuoli splendenti, che poi crescono e

costituiscono le spore. In uno stadio ulteriore di sviluppo i fili si spezzano e le spore diventano libere.

Condizioni indispensabili per la *sporificazione* di questi bacilli sono l'*umidità*, un certo *grado di calore* e fors'anche l'*esaurimento del materiale nutritivo*. Fra 30-40° C., dopo 24 ore lo sviluppo dei bacilli è compiuto e si hanno le spore; a 25° C. il tempo necessario a che le spore si formino sale già a 35-40 ore; a 23° C. sono necessarie 48-50 ore; a 21° C. 72 ore; a 18° C. cominciano a comparire le prime spore soltanto dopo 5 giorni, a 16° dopo 7 giorni ed in numero scarso. Al disotto di 16° la sporificazione non avviene (Koch).

Ciascuna spora è ovoidea e circondata da una massa rotonda, vitrea e trasparente. Riguardo al modo con cui avviene la germinazione delle spore, esistono ancora divergenze fra coloro che hanno cercato di determinarlo.

I bacilli del carbonchio crescono assai bene, come *saprofiti*, nei mezzi di nutrizione più svariati, quando però la reazione degli stessi non sia acida. Si sviluppano nei decotti di frutta, nei succhi di piante, nell'infuso di piselli, in quello di fieno neutralizzato, nell'urina neutra, nel brodo e nei mezzi di nutrizione solidi del Koch. Sulle patate crescono benissimo e sporificano: *fluidificano* la gelatina, sviluppandosi in questa sotto forma di *fiocchi*, che precipitano al fondo lasciando limpido il liquido soprastante. Le culture del bacillo nella gelatina distesa sui coproggetti, osservate al microscopio con un ingrandimento debole e con diaframma stretto, hanno un aspetto assolutamente caratteristico, che permette di differenziarle dalle altre specie consimili e di riconoscerne la purezza; le colonie appaiono sotto forma di filamenti lunghi e grossi, che si ripiegano al margine e si intrecciano in mille modi e in ogni senso, formando una rete veramente elegante.

I bacilli muoiono facilmente per opera della temperatura bassa od elevata, pel disseccamento e per la putrefazione: le spore invece sono assai resistenti (V. cap. I.).

Il bacillo carbonchioso è uno squisito parassita e trova nel sangue di molte specie di animali un terreno favorevole al

suo sviluppo. Ha un interesse speciale, sia perchè è il parassita vegetale della specie umana primo scoperto, come anche perchè si presta assai bene per lo esperimento, essendo facile a dimostrarsi ed inoculabile ad un gran numero di animali.

I topi (specialmente i topi bianchi), le cavie, i conigli, i ricci, le pecore, i vitelli, i porci, i cavalli, i gatti, i cani giovani (non quelli vecchi) inoculati con questo bacillo ammalano e muoiono rapidamente: i topi bianchi muoiono dopo 20 ore, i conigli dopo 40 ore. L'uomo pure ne ammala con quella forma morbosa, ch'è detta *pustola maligna*. Non è esatto che gli uccelli ne sieno immuni in causa della temperatura elevata del loro sangue (Pasteur): è stato constatato invece che gli uccelli di rapina ammalano di carbonchio, dopo aver mangiato carogne di animali carbonchiosi. Le passere sono pure sensibili all'innesto di questo microbo. Lo Spinola ha osservato il carbonchio nelle oche, nelle anitre ed in altri uccelli domestici. Gli animali a sangue freddo, pesci e rane, sono refrattari al carbonchio nelle condizioni ordinarie; però il Gibier è riuscito a produrre l'infezione nelle rane, tenendole nell'acqua riscaldata a 38° C.

La malattia in discorso è anzitutto caratterizzata dal fatto, che la milza contiene una gran quantità di microparassiti ed è fortemente rigonfia (*Milzbrandkrankheit* dei tedeschi). Questi si trovano inoltre molto abbondanti nel sangue ed accumulati nelle reti capillari, specialmente nei polmoni, nel fegato, nel rene e nell'intestino: nei grossi vasi invece sono scarsi. Si trovano anche nelle ghiandole linfatiche, ma non si trovano mai nei muscoli e neppure negli altri tessuti poveri di ossigeno.

Il bacillo, penetrato nel torrente circolatorio di uno degli animali anzidetti, cresce e si moltiplica nella forma già descritta, finchè inquina l'intiera massa sanguigna; collo sviluppo del parassita progredisce di pari passo la malattia, la quale termina ordinariamente colla morte.

La penetrazione del parassita nel sangue può avvenire sia direttamente, per mezzo dell'innesto artificiale fatto coi bacilli o colle spore, oppure per mezzo di una *ferita* accidentale, come avviene spesso nell'uomo. Una seconda via per la quale il microbo penetra nell'organismo è l'*intestino*, e qui naturalmente l'introduzione avviene per la bocca col mezzo degli alimenti. Se si ingerisce il virus sotto forma di bacilli, rimane inattivo, probabilmente perchè questi sono uccisi dal succo gastrico acido; ma se è sotto forma di spore, si ha l'infezione. Queste passano intatte attraverso lo stomaco, germinano nel contenuto alcalino dell' intestino, e si trovano poi i bacilli nell' interno della

mucosa intestinale, penetrando probabilmente attraverso i follicoli linfatici e dai capillari nel sangue. Nell'uomo l'infezione avviene o dall'intestino o da ferite della pelle, e produce sulla località dell'innesto un'infiammazione emorragica.

Secondo le esperienze di Brauell, ripetute e confermate più tardi anche da altri, il bacillo del carbonchio non passa dalla madre al feto: secondo Strauss e Chamberland invece (Compt. rend. 18 dec. 1882) potrebbe anche effettuarsi questo passaggio attraverso la placenta.

Secondo le ricerche di Buchner esisterebbe pure una terza via per cui ha luogo l'ingresso del parassita, e sarebbe l'*apparecchio respiratorio*. Anzi, stando ai risultati delle sue esperienze comparative, l'infezione negli animali avverrebbe più facilmente dal polmone che dall'intestino.

Il Koch invece ha trovato che l'infezione avviene il più delle volte per la via del canal digerente, ed ha inoltre ricercato in qual modo il virus penetra nell'intestino. Intanto una trasmissione diretta per tal via da un animale ammalato o morto per carbonchio non può avvenire, giacchè i bacilli *nel corpo dell'animale vivente* e *nell'interno del cadavere intatto* si moltiplicano bensì, ma *non producono spore*. Invece al difuori dell'organismo, in presenza dell'ossigeno e ad una temperatura superiore a 16° C., possono benissimo vegetare e riprodursi anche sotto forma di spore. Anzi, secondo le osservazioni del Koch, la patria naturale di questo essere non è già il corpo animale, ma il mondo esterno e con ogni probabilità sono i detritus vegetali in via di scomposizione.

È noto infatti con quanta facilità si sviluppa nelle sostanze organiche di origine vegetale (purchè non reagiscano acide fortemente), nelle quali può anche conservarsi per anni ed anni, riproducendosi per mezzo di spore. Niente di più facile adunque che queste si mescolino all'erba e sieno introdotte col cibo nel canale digerente di un animale suscettibile di ammalare; da questo la malattia si comunica facilmente agli altri coi quali convive, giacchè i bacilli possono riprodursi nel terreno col mezzo degli escrementi sanguinolenti degli animali gravemente ammalati, nei quali si contengono copiosi sotto forma di filamenti e di spore. Il D.re Kitt (1) hà recentemente convalidato quest'opinione del Koch, ed ha trovato che le materie fecali dei vitelli costituiscono un eccellente terreno solido di nutrizione pei bacilli carbonchiosi. Non v'è bisogno adunque che i germi del carbonchio sieno portati dal profondo del terreno alla superficie da portatori speciali (Pasteur); poichè bastano già a diffonderli su questa le escrezioni, fecali ed urinose, degli animali colpiti dalla malattia. È naturale poi che il pericolo dell'infezione sia tanto maggiore, se un animale ha lesioni di continuo nella pelle o nella mucosa degli organi digerenti.

La ragione per cui la malattia domina in certe località, piuttosto che in altre, non è ancora bene conosciuta. Il Koch dice che i luoghi preferiti dal carbonchio sono quelli umidi e visitati dalle inondazioni; e ciò perchè il

(1) Kitt, *Zur Aetiologie des Milzbrandes*, Separat-Abdruck a. d. Sitzungsber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. v. 10 febr. 1885.

bacillo specifico vegeta meglio all'umido che all'asciutto e perchè l'inondazione ne trasporta le spore, depositandole sulle piante che vengono quindi mangiate dagli animali.

Con questo non si esclude che il bacillo possa anch'essere portato e diffuso in una data località per mezzo dei cadaveri degli animali morti accidentalmente di carbonchio, specialmente per mezzo dei topi e di altri piccoli rosicanti, i quali prendono l'infezione molto facilmente. L'ipotesi del Pasteur, che il bacillo in discorso sia portato nel terreno cogli animali carbonchiosi sotterrati e che le spore vengano portate di nuovo alla superficie per mezzo dei *lombrici*, i quali le ingoiano e le rimettono fuori quindi colle feci, non pare ammessibile alla stregua dei fatti osservati. Anzitutto è provato che negli strati profondi del terreno in molte località ove il carbonchio mena strage, come ad es., in Siberia, mancano alcune delle condizioni (temperatura) necessarie alla produzione delle spore, e fors'anco quelle per la vita del bacillo; in secondo luogo poi il Koch ha pure provato coll'osservazione diretta che i lombrici non sono portatori dei germi carbonchiosi. — Il Koch ha inoltre dimostrato che dai cadaveri di animali carbonchiosi sotterrati i bacilli non si moltiplicano, giacchè i pezzi di cadavere ed i saggi di terra presi dall'immediata vicinanza degli stessi dierono sempre, innestati negli animali, risultati negativi.

Si è già detto che si può diminuire ed anche annientare la virulenza del bacillo carbonchioso, coltivandolo ad un certo grado di temperatura in una soluzione nutritiva neutra (brodo). L'attenuazione di questo virus mantenuto a 43° C. è già completa dopo 6 giorni, a 42° C. dopo 30 giorni e alla temperatura di 16-20° C. procede assai lentamente. Il bacillo coltivato in tal guisa vegeta e si riproduce senza cambiare per nulla le sue proprietà morfologiche, ma *non sporifica*. Le culture mantenute a 42-43° C. muoiono dopo un mese; 1 o 2 giorni prima di quest'epoca si possono ancora riprodurre, innestandone una piccola quantità in un nuovo mezzo di nutrizione. Avvi un certo grado di attenuazione nel quale il bacillo può riacquistare di nuovo la virulenza primitiva, se s'innesta in un animale suscettibile, il quale muore: questo punto si ha quando il virus non uccide più le cavie adulte, ma uccide ancora quelle giovani; innestandolo allora in quest'ultime, il virus attenuato acquista di nuovo il suo potere altamente infettante. Quando però l'attenuazione è completa, il ripristino della virulenza non si può più ottenere in alcun modo.

Il bacillo carbonchioso ha molti punti di rassomiglianza morfologica con un'altra specie di bacillo, patogeno anch'esso (specialmente per le cavie), il quale si trova diffuso in gran copia negli strati superficiali del terreno, nei liquidi in putrefazione, specialmente nel sangue putrefatto, ed anche nella polvere che copre il fieno (Koch). È questo il bacillo « dell'edema maligno » le cui caratteristiche, che servono a differenziarlo da quello del carbonchio, si trovano esposte più sotto fra le proprietà biologiche dello stesso.

Notiamo intanto che lo scambio fra le due specie è già accaduto a parecchi osservatori, non ultimo dei quali è il Buchner, il quale è stato condotto da questo errore a concludere che il bacillo del fieno (Heubacillus), che non ha proprietà patogeniche, possa, coltivato in determinate condizioni di nutrizione e di temperatura, trasformarsi in bacillo carbonchioso ed acquistare proprietà altamente infettanti; ammettendo così che i due bacilli sieno due semplici forme di sviluppo di un'unica specie, differenti fra loro per essere l'una innocente e l'altra virulenta in sommo grado. Quest'opinione è stata battuta in breccia dal Koch, il quale ha dimostrato che la conclusione erronea di Buchner proveniva da insufficienza del metodo, dall'avere adoperato, cioè, mezzi liquidi non bene sterilizzati, in alcuni dei quali si erano probabilmente mescolati i germi del bacillo dell'edema maligno, che fu scambiato da Buchner col bacillo carbonchioso.

Lo Zopf istesso, che nella 4ª edizione del suo manuale sugli « Spaltpilze » sosteneva a spada tratta l'idea di Buchner, nella nuova edizione più recente (1885) l'ha quasi abbandonata del tutto, ed accenna anzi alle differenze che esistono fra le due specie di bacilli (bacillo del fieno o « bacillus subtilis » e bacillo carbonchioso).

Una prima differenza esiste nella forma dei filamenti e nella loro segmentazione, nonchè nel fatto che il bacillo del fieno è *mobilissimo* e possiede le ciglia, all'opposto di quello del carbonchio che è immobile perfettamente. Questo infatti nei liquidi forma sul fondo una specie di nubecola, composta da un intreccio di filamenti, mentre il resto del liquido rimane perfettamente chiaro. Le culture del « bacillus subtilis » invece appaiono torbide fin da principio e formano sulla superficie una pellicola zoogleica spessa. La caratteristica differenziale più importante è però quella che i bacilli del fieno, coltivati veramente allo stato di purezza, non sono mai patogeni.

Bacillo dell' edema maligno.

È stato studiato esattamente dal Koch (1) e dal Gaffky (2), mentre il Pasteur (3) lo aveva prima descritto come l'agente pro-

(1) Koch, Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. I, p. 54.
(2) Gaffky, *Experimentelle erzeugte Septicämie.* Ibid. p. 80.
(3) Pasteur, Bull. de l'Acad. de méd. 1877, p. 793.

duttore di una forma speciale di setticemia, sotto il nome di *vibrion septique*. I bastoncini sono lunghi da 3 a 4,5 μ e larghi 1,1 μ: sono per lo più riuniti a due a due e quindi lunghi il doppio, oppure anche riuniti in filamenti di 20-40 μ. Si differenziano dai bacilli del carbonchio:

1° Perciò che questi ultimi sono un poco più larghi dei primi e nei preparati fatti sui coproggetti mostrano la loro segmentazione caratteristica, la quale appare manifesta specialmente se la colorazione è fatta col bruno d'anilina e manca invece nei bacilli dell'edema, *trattati collo stesso processo*.

2° Perchè questi talora sono mobili (soltanto però in certe circostanze) e quelli del carbonchio non lo sono giammai. Un tal carattere differenziale è bensì in ogni caso malsicuro, perchè si può benissimo aver un'infezione mista con ambedue le specie in discorso.

3° Nel cadavere dell'animale morto per carbonchio si trovano i bacilli soltanto nell'interno dei vasi, mentre nell'edema maligno il sangue (nelle cavie e nei conigli) non contiene nessun bacillo o tutt'al più ne contiene soltanto qualche forma isolata: i bacilli caratteristici si trovano invece abbondanti alla superficie degli organi, e specialmente nel contenuto sieroso delle grandi cavità corporee. Nei topi questa differenza non esiste e lo scambio fra le due malattie è molto più facile, giacchè anche i bacilli dell'edema esistono abbondanti nell'interno dei vasi. Neppure in questi però manca l'altra caratteristica differenziale importante, rappresentata dall'*edema* che si sviluppa sul luogo dell'innesto, nel cui liquido sono assai numerosi i bacilli; edema che manca, se si tratta d'innesto carbonchioso *puro*.

4° Finalmente un'altra differenza esiste nella inoculabilità delle due specie di bacilli. Per quello del carbonchio basta, perchè attecchisca, il semplice *innesto cutaneo* fatto con una piccolissima quantità di materiale; mentre il bacillo dell'edema non produce la malattia, se non quando venga introdotto nel tessuto sottocutaneo in discreta quantità e per mezzo dell'*iniezione*, giacchè anche tagliando il derma a tutto spessore ed ap-

plicandovi il materiale da innesto, la malattia non si sviluppa tutte le volte. Questo fatto è forse dovuto a ciò che il bacillo in questione appartiene alla classe degli *anaerobi* di Pasteur. — Come i topi bianchi sono sensibilissimi pel carbonchio, così lo sono pel bacillo dell'edema le cavie a preferenza di tutti gli altri animali.

Il bacillo dell'edema maligno è assai diffuso in natura e vive quale « saprofita » negli strati superficiali del terreno (terra dei giardini), nella polvere del fieno, nei liquidi in putrefazione più diversi e specialmente nei cadaveri degli animali annegati, lasciati a sè molto tempo a temperatura elevata. Finora questa malattia è stata riprodotta nella cavia, nel coniglio e nel topo bianco; nell'uomo ne è stato descritto un caso da Brieger e da Ehrlich (1) in un ammalato di tifo, nel quale in seguito ad un'iniezione sottocutanea di muschio si sviluppò un vasto edema infiammatorio con sviluppo di bolle di gaz, e nel liquido dell'edema si trovarono numerosi i bacilli caratteristici.

Basta prendere un po' di terra di giardino, farla disseccare a sufficienza, perchè vengano uccisi tutti i micrococci che contiene e rimangano in vita soltanto le spore del bacillo, e metterla in una piccola saccoccia scavata sotto la pelle di uno degli animali anzidetti, per vederli ammalare e morire dopo 44-48 ore.

Alla necroscopia si trova, come sintomo predominante, un edema del tessuto sottocutaneo, che parte dal punto d'innesto e si estende ampiamente, contenente un liquido inodoro, chiaro, sanguinolento, ricchissimo di bacilli e con qualche bolla di gaz. Gli organi interni invece sono quasi inalterati: la sola milza è fortemente tumefatta e di colore oscuro, i polmoni rosso-grigiastri. Immediatamente dopo la morte nel sangue del cuore, nei conigli e nelle cavie, non si trova nessuno o qualche raro bacillo; si trovano abbondanti invece alla superficie degli organi avvolti dalle sierose. Poco tempo dopo la morte sono già addivenuti ab-

---

(1) Brieger u. Ehrlich. Berl. klin. Wochenschr. 1882.

bondanti dappertutto, anche nel sangue del cuore. Nei topi bensì, anche subito dopo la morte, si trovano in gran copia i bacilli nel sangue.

Dal quadro sinora descritto risulta che la malattia prodotta da questo bacillo, che non è altro che il cosidetto « vibrion septique » di Pasteur, non ha i caratteri di una vera e pura « setticemia »; difatti si ha reazione sul luogo dell'innesto, è necessaria una quantità di materiale relativamente grande, introdotto sotto la pelle, per produrre l'infezione ed i microbi non si moltiplicano nel sangue durante la vita (eccetto che nei topi bianchi). Meglio adunque si addice per questa forma morbosa il nome di « edema maligno », proposto dal Koch, tanto più che dalla descrizione che ne ha fatto il Pasteur sembra che questi abbia avuto sempre sott' occhio una forma d' infezione mista, complicata cioè con un'altra forma di setticemia o con fenomeni d'intossicazione, provenienti dalla sostanza putrida che usava per gli innesti.

Recentemente il D.re Kitt (1) ha fatto anche gli innesti in varii animali col prodotto delle culture nette di questo bacillo, ottenendo la riproduzione fedele del quadro morboso sopra descritto. Egli ha pure confermato il fatto, che il bacillo dell'edema si sviluppa soltanto lungi dal contatto dell'aria ed a temperatura elevata.

La coltivazione di questo bacillo al difuori dell'organismo riesce assai difficilmente. Il Pasteur lo ha fatto sviluppare nel siero sanguigno e nella soluzione d'estratto di carne Liebig neutralizzata, lungi dal contatto dell'aria, in un'atmosfera di CO^2 e lo ha classificato per ciò fra gli anaerobi. Il Gaffky è riuscito a coltivarli sulle patate, mettendo un pezzo di fegato contenente i bacilli nell'interno di una patata cotta, ricoprendolo subito con un altro pezzo di patata e tenendolo ad una temperatura di 38° C. Dopo qualche giorno si trova il tessuto della patata, vicino al pezzo di fegato, attraversato da una rete di bacilli. Un pezzo della patata si può innestare in un' altra; ed inoculando tali colonie nelle cavie, queste muoiono dopo poche ore. Mancano ancora osservazioni esatte sulla sporificazione di questo bacillo.

(1) Kitt, *Die pathogene Bedeutung der Oedembacillen*, Oesterr. Monatsschr. f. Thierheilkunde, 11/1884.

Bacillo del carbonchio sintomatico (Rauschbrand dei tedeschi) (1).

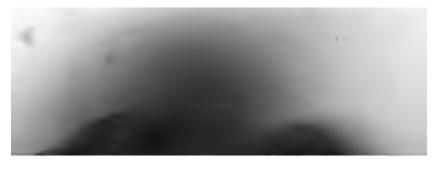
Questa speciale malattia è stata studiata e differenziata dal vero carbonchio per opera anzitutto del Bollinger, e si incontra talora endemica nel bestiame bovino. La causa del carbonchio sintomatico risiede in una forma di bacillo speciale, più corto e più grosso di quello del carbonchio e colle estremità arrotondate. È mobile e provvisto per lo più di una spora splendente situata ad uno dei poli. Negli animali morti per tal malattia i bacilli si trovano d'ordinario nel tessuto sottocutaneo, nelle ghiandole linfatiche, nei reni, nella milza e nei polmoni.

La malattia è caratterizzata dalla comparsa in un punto qualunque della pelle di un tumore, che si ingrossa rapidamente e lascia sentire nel centro un crepitio manifesto, dovuto allo sviluppo di gaz che producono, moltiplicandosi, i microbi specifici. La morte avviene dopo 36-48 ore, accompagnata da un forte abbassamento della temperatura del corpo.

Innestando un pezzo di un organo che contenga i bacilli, oppure la sostanza stessa del tumore nei vitelli, agnelli, conigli e cavie, si riproducono in questi gli stessi fenomeni morbosi: ne sono immuni invece i ratti, i cani, ed i polli. L'iniezione diretta nelle vene sembra agire meno attivamente dell'innesto sottocutaneo. Iniettando una piccola quantità di materiale sia nelle vene che sotto cute, si sviluppa una forma abortiva che rende immune l'animale dagli innesti ulteriori.

La coltivazione artificiale di questo microbo non è ancora riuscita.

---

(1) Bollinger, Deutsche Zeitschr. f. Thiermedicin 1878-79. — Aloing, Cornevin et Thomas, Bull. de l'Acad. de méd. 1881 e 1883. — Röll, *Die Thierseuche*, Wien 1881.

Bacillo della tubercolosi (Koch).

La natura parassitaria della tubercolosi era stata già da tempo indirettamente stabilita dallo studio dell'anatomia patologica e dal modo di decorrere dell'infezione tubercolare, specialmente poi dai risultati degli innesti, fatti anzitutto dal Villemin e ripetuti quindi da Biffi e da Verga (1), da Mantegazza e da Armanni (2) in Italia, e da Baumgarten, Tappeiner e da altri in Germania (3), i quali stabilirono in maniera positiva la trasmissibilità della tubercolosi dall'uomo agli animali e quindi il posto della stessa fra le malattie da infezione. Mancava tuttavia di determinare la natura del contagio, per quanto alcuni avessero anche descritto varie forme di microrganismi, quali agenti specifici della malattia (Klebs, Schüller, Toussaint).

---

(1) Verga e Biffi, *Sulla inoculabilità della tubercolosi*, Rendiconti del R. Istituto Lombardo, 1867 seduta del 25 luglio, e 1868 seduta del 26 novembre.

(2) Armanni, *Sulla specificità e virulenza delle sostanze caseose e tubercolose*, Il Movimento medico-chirurgico, Napoli 1872, N. 30, 31 e 32.

(3) Qui mi piace di far rilevare una grave inesattezza, in cui sono caduti gli scrittori tedeschi (non escluso il Koch) nel delineare la storia della scoperta dell'eziologia della tubercolosi. Oltre che da nessuno si fa menzione dei lavori italiani suaccennati, i quali hanno preceduto quelli tedeschi (parlo di quelli che ottennero risultati positivi), si pone in prima linea il nome di Cohnheim fra quelli che hanno dimostrato la natura infettiva, specifica del virus tubercolare. Il Cohnheim invece nel suo primo lavoro, pubblicato sull'argomento insieme con Fränkel (Virchow's Archiv, Bd 45, 1869, p. 216), ha concluso col negare la dottrina del Villemin, ed in seguito ha mostrato di accettarla solamente quando la specificità del tubercolo era già stata luminosamente posta in sodo da molti e seri sperimentatori.

Si attribuisce inoltre a lui il merito di avere per primo fatto gli esperimenti in modo (innesto nella camera anteriore dell'occhio) da escludere l'influenza perturbatrice del processo infiammatorio concomitante, e di aver dimostrato nella tubercolosi da innesto un periodo d'incubazione (Cohnheim e Salomonsen, *Ueber künstl. Tuberc.*, a. d. Sitz.-ber. d. schles. Ges., 1877). Ma la dimostrazione di questo fatto era stata già data molto tempo prima, nel 1872, da Armanni (lavoro citato), il quale avea inoltre operato gl'innesti in una località *(cornea)* ove la purezza dell'esperimento non poteva essere

Nel 1882, quasi contemporaneamente, il Koch (1) ed il Baumgarten (2), il primo valendosi di un processo speciale di colorazione, il secondo invece giovandosi dell'azione dissolvente degli alcali, descrissero una forma speciale di bacillo specifico, diversa da tutte le altre antecedentemente osservate. Spetta però al Koch il merito di avere dimostrato la natura parassitaria della tubercolosi col metodo scientifico più rigoroso e con esperienze numerosissime, le quali ripetute ebbero da ogni dove una splendida conferma. Il Koch ha provato che la causa di tutte le diverse forme morbose, che si raccolgono sotto il nome di « tubercolosi » (tubercolosi miliare dell'uomo e degli animali, scrofolosi, infiammazione fungosa delle articolazioni, lupus ecc.), risiede in uno speciale microparassita, il quale alberga negli organi più diversi, secondo le varie forme di malattia, e si trova quindi nei polmoni, nel fegato, nella milza, nei reni, nel peritoneo, nell'intestino, nelle ghiandole, nella pelle, nel cervello, e così via, tanto nell'uomo come negli animali (scimmie, buoi, cavalli, pecore, maiali, cani, gatti, conigli, cavie, ecc.).

I bacilli del Koch si presentano sotto la forma di bastoncini isolati (Tav. 2ª fig. I e II), molto più sottili di quelli del carbonchio, lunghi 2-4 μ, raramente 8 μ (quando sono riuniti in due), colle estremità arrotondate e prívi di movimenti propri. Sono spesso riuniti a fascetti e contengono talora, anche nell'interno dell'organismo animale, due o quattro *spore* di forma ovale. Questi bacilli si trovano in tutti i prodotti patologici della malattia ed in tutti gli stadi della stessa. Si trovano perciò nei nodi tubercolari giovani, per lo più nell'interno delle cellule gi-

---

menomamente turbata dal processo infiammatorio; col vantaggio anzi su metodo di Cohnheim, che invece di introdurre pezzi di materiale tubercolare, introduceva quantità piccolissime di virus (ago bagnato nelle masse caseose), producendo in tal guisa uno degli argomenti più validi in appoggio della teoria dell'infettività della malattia.

(1) Kock, *Die Aetiologie der Tuberculose*. Berl. klin. Wochenschr. No. 1 10 aprile 1882.

(2) Baumgarten, *Tuberkelbacterien*. Centralbl. f. d. med. Wissens. 1882, No. 15, p. 257 e No. 19, p. 337.

gantesche, come in quelli caseificati. Si trovano pure abbondanti nel contenuto delle caverne polmonari, e quindi nello sputo, durante tutto il decorso della tisi polmonare tubercolare.

Il reperto dei bacilli tubercolari nello sputo, relativamente alla *diagnosi* ed alla *prognosi* della malattia, è tuttora oggetto di contestazioni: o a meglio dire, per rapporto alla *diagnosi*, la loro presenza negli sputi indica sicuramente l'esistenza del processo specifico tubercolare, mentre però questo non si può escludere con altrettanta sicurezza, allorquando la ricerca dei bacilli riesca negativa; riguardo alla *prognosi* poi, non si è finora dimostrato che il numero dei bacilli nello sputo stia in proporzione dell'estensione e della gravità del processo tubercolare.

Secondo Balmer e Fräntzel (1) i bacilli si trovano costantemente nello sputo in tutti i casi ed in tutti gli stadi della malattia, ed avrebbero perciò un valore diagnostico sicuro e costante. Essi affermano inoltre che il numero dei bacilli che si trovano nell'escreato può anche avere un certo valore prognostico, inquantochè nei casi più gravi sono più numerosi e crescono di quantità col progredire del male. — Anche il Gaffky (2) li ha trovati quasi costantemente nello sputo dei malati di tisi polmonare.

Il Lichtheim (3) invece, da una serie numerosa di ricerche conclude che i bacilli si trovano copiosi nell'escreato purulento dei tisici, ma che la loro presenza è necessariamente legata all'esistenza di un processo specifico di distruzione del polmone, comunicante colle vie aeree, e che non si trovano invece ogni volta che manca cotesta condizione, anche se esiste già la tubercolosi.

Se questa conclusione fosse vera, i bacilli non dovrebbero trovarsi nello sputo nei casi di tubercolosi miliare acuta, ed invece sono stati anche in questa più volte constatati. Certamente il maggiore interesse di questo reperto, per stabilire il diagnostico, sarebbe nel periodo iniziale della malattia, quando mancano ancora i fenomeni di distruzione del polmone, ed i segni fisici sono scarsi o non si possono raccogliere; ma a questo riguardo l'incertezza è anche maggiore, giacchè alcuni dicono di avere constatato la presenza dei bacilli nello sputo sanguigno, che segna l'inizio della tubercolosi acuta, ed altri invece affermano di avere avuto in casi consimili un risultato negativo.

Relativamente al valore prognostico di questo esame bisogna andar molto cauti, essendo provato che i bacilli trovano un terreno adatto pel loro

---

(1) Balmer u. Fraentzel, *Ueber d. Verhalten der Tuberkelbacillen im Auswurf während des Verlaufs der Lungenschwindsucht*, Berl. klin. Vochenschr. 1882, No. 45.

(2) Gaffky, *Ein Beitrag zum Verhalten der Tuberkelbacillen in Sputum*. Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. II, p. 126.

(3) Lichtheim, *Zur diagnostischen Verwerthung der Tuberkelbacillen*, Fortschritte der Medicin, 1883, No. 1.

sviluppo nel contenuto stesso delle caverne polmonari e nello sputo; sicchè. quando per una cagione qualsiasi questo ristagna qualche tempo entro il polmone, si può facilmente cadere in errore nel giudicare un aggravarsi del male. Lo stesso Fräntzel dice di avere osservato che nei giorni più caldi della state i bacilli nello sputo degli individui tubercolosi sono numerosissimi. Quello che è certo si è che negli ultimi periodi della malattia i bacilli nell'escreato aumentano di quantità, ma è altrettanto sicuro che gli stessi possono talora scomparire dall'espettorato, anche per parecchi giorni. Nei casi dubbi adunque è necessario non soltanto di fare ogni giorno un gran numero di preparati collo stesso materiale, ma di ripetere anche l'esame per parecchi giorni consecutivi, specialmente se si vuole in pari tempo giudicare della gravezza del caso e stabilire un prognostico, per quanto approssimativo.

Per agevolare il còmpito della ricerca dei bacilli negli sputi, si può usare il seguente processo imaginato dal Dr. Lang di Breslavia. Si mette l'escreato in un vetro da orologio contenente 5-6 gr. di acqua dist., addizionata con 3-4 goccie di soluzione di potassa al 33 %, e vi si lascia macerare per ½ ora: in tal guisa una gran parte dello sputo si discioglie, scompaiono le bolle d'aria e si distinguono nella massa un certo numero di *strie verdastre* o di piccoli fiocchi, che si rendono visibili collocando il vetrino sopra un fondo nero. È in questi fiocchi che si devono ricercare specialmente i bacilli tubercolari. I preparati si fanno e si colorano coi processi già descritti (Cap. III).

Gli sputi adunque, i quali contengono i bacilli sporigeni, costituiscono un materiale d'infezione abbondante, che si riversa all'esterno e che, disseccandosi e riducendosi in polvere, costituisce forse uno dei mezzi di diffusione più temibili e più ordinari della malattia. Il Koch appunto, partendo dal fatto che la maggior parte dei casi di tubercolosi ha la sua origine nel polmone, ritiene che qui si tratti di una forma d'infezione *da inalazione*, proveniente, cioè, dalla inspirazione di particelle di sputi infetti, disseccati e polverizzati. Secondo il Koch non appena i bacilli sono penetrati nei bronchi, siccome il loro sviluppo è assai lento, sono necessarie perchè si moltiplichino speciali circostanze, che li trattengano là dentro e ne impediscano la eliminazione insieme agli ordinari prodotti muco-epiteliari delle vie

aeree. Quindi le malattie che denudano la mucosa dell'epitelio che la riveste e quelle che cagionano la formazione di secreti stagnanti, nonchè quelle conformazioni toraciche che permettono l'accumulo delle secrezioni (piccola escursione respiratoria) sono cause che predispongono alla tubercolosi.

Lo studio della *profilassi* della tubercolosi è stato principalmente diretto a rendere innocuo il materiale di escrezione polmonare dei tisici. Schill e Fischer (1) hanno studiato accuratamente l'azione dei vari mezzi di disinfezione sugli sputi, ed hanno ottenuto risultati molto interessanti per l' igiene. Diggià il Koch avea trovato che gli sputi dei tubercolosi, disseccati, mantengono la loro virulenza anche dopo 2, 4 ed anche 8 settimane. Prolungando però l'osservazione al di là di questi limiti, Schill e Fischer hanno trovato che la resistenza delle spore di questi bacilli al disseccamento ha pure un limite, giacchè gli sputi essiccati dopo 143 giorni aveano già perduto alquanto il loro potere infettante, ed al 186° giorno lo aveano perduto completamente. Essi hanno sperimentato perciò l'azione dei mezzi di disinfezione tanto sugli sputi *secchi* che su quelli *freschi*. Un primo fatto importante, che risulta da queste ricerche, è che la putrefazione del materiale fluido non altera la potenza specifica dei bacilli. A questo riguardo è da notare però che ricerche ulteriori di Baumgarten (2) e di Falck (3) avrebbero dimostrato un'attenuazione della virulenza dei bacilli nei prodotti patologici tubercolari, per opera della putrefazione. La corrente di vapor d'acqua rende sterili gli sputi secchi in 30 minuti, o in 1 ora al più, e quelli freschi in 15 minuti; sicchè si può dire che questo è il mezzo pratico di disinfezione più sicuro. Lo stesso effetto si ottiene colla cottura prolungata per 10 o 20 minuti.

Senza esporre in dettaglio i vari agenti disinfettanti che possono distruggere il potere infettivo degli escreati, per l'applicazione pratica basti il sapere che il sublimato è poco adatto alla disinfezione degli sputi freschi, dovendosene usare soluzioni piuttosto concentrate, e che invece aggiungendo a quelli un egual volume di soluzione d'acido fenico al 5 %, si ottiene dopo 24 ore una sterilizzazione sicura.

Celli e Guarnieri (4) hanno ricercato se facendo passare l' aria attraverso gli sputi, oppure facendo strisciare una

---

(1) Schill u. Fischer, *Ueber die Desinfection des Auswurfs der Phthisiker*, Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. II, p. 131.

(2) Baumgarten, *Ueber die Uebertragbarkeit der Tuberkulose durch die Nahrung und über Abschwächung ecc.* Centralblatt f. klin. Med. 1884, No. 22.

(3) Falck, Berl. klin. Wochen., 1883, No. 50.

(4) Celli e Guarnieri, *Intorno alla profilassi della tubercolosi*, Archivio per le scienze mediche, 1883, vol. VII, p. 233.

corrente d'aria sulla superficie degli stessi, quell'aria esportasse con sè i bacilli tubercolari, ed hanno ottenuto costantemente risultati negativi.

Non è però ancora positivamente stabilito se nell'*aria di espirazione* dei tisici esistono i bacilli. Gli autori ora citati hanno fatto anche esperienze dirette sul proposito, con risultato sempre negativo. Al contrario le osservazioni di Ransome (1), di Van Ermengem (2) e di Casse (3), i quali si sono posti nelle condizioni migliori per evitare le cause d'errore e specialmente la contaminazione con particelle di sputo, parlano per la presenza dei bacilli nell'aria d'espirazione dei tisici, anche all'infuori degli accessi di tosse. Il Fränkel (4) ha creduto anzi di poter far servire la constatazione di questo fatto per la diagnosi della tubercolosi laringea.

I bacilli tubercolari sono stati trovati anche nelle *feci* anzitutto da Lichtheim, e nelle *orine* da Babes (5) e da Rosenstein (6). In seguito le osservazioni a questo riguardo si sono moltiplicate, ed oggi il reperto dei bacilli specifici nelle feci e nelle orine serve utilmente pel diagnostico dell'infezione tubercolare nell'intestino e negli organi uropoietici.

Anche nel *sangue* degli individui affetti da tubercolosi acuta sono stati trovati i bacilli. Già il Baumgarten avea dimostrato che il sangue degli animali innestati col virus tubercolare,

---

(1) A. Ransome, *Note on the discovery of Bacilli in the condensed acqueous vapor of the breath, of persons affected with phthisis.* Brith. med. Journ. 1882.

(2) Van Ermengem, *Comunicazione fatta alla* « Société belge de microscopie » 27 gennaio 1883.

(3) Casse, *Sur l'air expiré par les phtisiques*, Bulletin de la Société belge de microscopie, 24 febbr. 1883.

(4) Fraenkel, *Comunicazione fatta alla* « Verein f. inn. Med. zu Berlin ». 25 ott. 1882.

(5) Babes, *Der erste Nachweis der Tuberkelbacillen im Harn*, Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1883, p. 145.

(6) Rosenstein, *Vorkomm. d. Tuberkelbacillen im Harn*, Centralbl. f. d. med. Wissensch, 1883, No. 3 e No. 10.

ammalati gravemente, possiede proprietà infettive, ossia è atto a riprodurre la tubercolosi in altri animali. Il Weigert ha quindi trovato che nella tubercolosi miliare i trombi formatisi nell'interno dei vasi sanguigni contengono bacilli. La dimostrazione diretta bensì di questi elementi nel liquido sanguigno è stata data la prima volta da Weichselbaum (1), il quale li ha trovati nel sangue dei cadaveri di tre individui, morti per tubercolosi miliare. In seguito Meisels (2) ha ottenuto lo stesso reperto nel cadavere di 8 individui, morti per la stessa forma morbosa; e Lustig (3) in un caso osservato nella clinica del Bamberger li ha pure dimostrati nel sangue durante la vita.

Nel *pus* degli ascessi tubercolari, delle articolazioni o delle ghiandole scrofolose i bacilli non si rinvengono che assai raramente.

La ricerca dei bacilli tubercolari ha servito a gettare un po' di luce sul fatto, rimasto finora misterioso, della *ereditarietà* della tubercolosi, ossia della trasmissione dell'infezione dai genitori al feto. I fatti finora osservati non sono in gran numero, ma sono stati bene constatati ed hanno quindi un certo valore dimostrativo, tanto da far ritenere prossima la soluzione dell'importante problema.

Già Schleuss e Grothaus (4) aveano osservato l'esistenza della tubercolosi congenita nei feti dei bovini; ma il primo caso di questo genere, positivamente dimostrato, nel quale viene esclusa qualsiasi possibilità di un'infezione estrauterina, è stato recentemente descritto dallo Johne (5), il quale ha constatato coll'esame macroscopico e con quello dei bacilli specifici la presenza di nodi tubercolari nei visceri di un feto di vitello di 8 mesi, estratto dall'utero della madre, uccisa perchè riconosciuta affetta da tubercolosi polmonare.

Landouzy e Martin (6) hanno anche cercato di risolvere mediante ricerche sperimentali la questione, se l'eredità della tubercolosi avvenga per trasmissione diretta, oppure se invece si trasmetta soltanto la disposi-

(1) Weichselbaum, *Ueber Tuberkelbacillen im Blute bei allgemeiner acuter Tuberkulose*, Wiener medicinische Wochenschrift, 1884, No. 12 e 13.
(2) W. Meisels, *Weitere Mittheil. u. d. Vorkommen von Tuberkelbact. im Blute bei der allgem. Miliartub.* Wien. med. Woch. 1884, No. 39 e 40.
(3) Lustig, *Ueber Tuberkelbacillen, ecc.* Wien. med. Woch. 1884, No 48.
(4) Schleuss u. Grothaus, *Beiträge zur Casuistik der Congenität der Tuberkulose*, Mitth. a. d. thierärztl. Praxis im Pr. Staate. N. Flg. VIII.
(5) Johne, *Ein zweifelloser Fall von congenitaler Tuberkulose*, Fortschritte der Medicin, 1885, No. 5.
(6) Landouzy et Martin, *Faites cliniques et expérimentaux pour servir à l'histoire de l'hérédité de la tuberculose.* Revue de méd., 1882, N. 12.

zione ad ammalare della stessa malattia: e lo hanno fatto prendendo per materiale d'innesto i feti di apparenza macroscopica normale, estratti da madri tubercolose, e lo sperma ed il succo di testicoli, apparentemente sani, ma appartenenti ad animali tubercolosi. I risultati di questi innesti sarebbero stati positivi, ma la conclusione che ne hanno voluto trarre gli autori suddetti, di avere cioè sicuramente dimostrato la trasmissibilità diretta della tubercolosi dalla madre al feto per la via dell'utero, e dal padre nell'atto del concepimento, mi sembra ancor prematura, giacchè il numero delle esperienze è troppo esiguo e non esclude la possibilità di una tubercolosi accidentale negli animali innestati.

Relativamente alle vie che segue l'agente infettivo tubercolare per penetrare nel nostro organismo, gli sputi disseccati e polverizzati costituiscono con ogni probabilità uno dei mezzi di diffusione più comuni del virus il quale, introdotto coll'aria nell'apparecchio respiratorio, può riprodurre la malattia ogni volta che vi trova le condizioni favorevoli pel suo sviluppo.

E non soltanto lo sputo disseccato, ma anche lo sputo fresco può farsi veicolo di trasmissione della malattia. A questo proposito giova ricordare un caso, interessante anche perchè è il primo che dimostra la inoculabilità della tubercolosi nella specie umana, riferito di recente dal D.r Tscherning di Copenaga (1). Il caso si riferisce ad una persona di servizio, senza alcun precedente gentilizio neanche lontano, la quale nel lavare la sputacchiera del padrone, ammalato di tubercolosi polmonare, la ruppe e si ferì con un frammento di vetro nella parte palmare del dito mediano. Dopo un mese si manifestò una tumefazione lungo la guaina dei tendini fino al palmo della mano, accompagnata da tumefazione delle ghiandole cubitali ed ascellari. In tutte queste parti ammalate, che furono poi esportate coll'operazione chirurgica, si trovarono numerosi i bacilli specifici, colorati col metodo Koch-Erlich.

Sembra però che non sempre i polmoni sieno il punto di partenza di questa malattia, e che in certi casi la tubercolosi si sviluppi *primitiva* in altri organi e secondariamente si propaghi poi anche al polmone. Si parla infatti di una tubercolosi primitiva del rene e del mediastino, ed alcuni fatti osservati tendono anche a dimostrare la trasmissibilità del male per la via degli organi genitali nell'accoppiamento.

---

(1) Tscherning, *Inoculationstuberculose beim Menschen*. Fortschritte d. Med. No. 3, 1885.

Un'altra via per cui può penetrare l'agente specifico è quella del *canale digerente;* e qui fra gli alimenti bisogna rivolgere principalmente l'attenzione al *latte*, specialmente a quello delle vacche, le quali facilmente ammalano di tubercolosi, sia generale come locale della mammella, il cui secreto possiede in tal caso proprietà eminentemente infettive.

Lo Stein (1) ed altri aveano diggià fatto ricerche sulla virulenza del latte delle vacche tubercolose, con risultati in parte positivi; ma assai più concludenti al riguardo sono le osservazioni ultime del Bang (2), il quale ha trovato anzitutto che la tubercolosi delle mammelle nelle vacche da latte è molto più frequente di quello che generalmente si creda, e che inoltre il secreto mantiene il suo aspetto normale per circa un mese dopo iniziata la malattia, mentre invece è già atto, inoculato negli animali, a riprodurre l'infezione, giacchè contiene numerosi bacilli tubercolari con spore. Egli ha inoltre osservato che quando un lobo della mammella è ammalato, ed il resto della ghiandola apparentemente normale, il latte di quest'ultima ha tuttavia proprietà infettanti verso gli animali (maiali e conigli) a cui si fa ingerire. Un altro fatto di grande importanza, messo in luce pure dal Bang, è che il latte secreto dalle vacche affette da tubercolosi generale, le quali hanno le mammelle apparentemente normali, contiene egualmente i bacilli ed ha proprietà infettanti. Egli avrebbe inoltre trovato che il riscaldamento a 65° C., per 5 minuti, del latte virulento serve soltanto a diminuire le proprietà infettive di questo liquido, e che riscaldandolo a 70°, diventa invece innocuo assolutamente.

Questi fatti addimostrano la necessità di una sorveglianza rigorosa delle vacche, da cui si ricava il latte per la nostra ali-

---

(1) Stein, *Experimentelle Beiträge zur Infectiosität der Milch perlsüchtiger Kühe*, Diss. Berlin 1884.

(2) Bang, *Ueber die Eitertuberkulose der Milchkühe und über tuberculose Milch*, Deutsche Zeitschrift f. Thiermed. u. vergl. Pathologie, Bd. XI, p. 45, 1885.

mentazione, ed in ogni caso il dovere di farlo bollire prima di usarlo per questo scopo.

La *trasmissibilità* della tubercolosi è stata provata con esperienze numerosissime in molte specie di animali e con ogni sorta d' innesti, sotto cute, e nella cornea, nell'addome, nel sangue, nella camera anteriore dell'occhio e col cibo per la via degli organi digerenti: soltanto coll'innesto cutaneo semplice, fatto, cioè, in una ferita superficiale, l'infezione non avviene.

La *coltivazione* di questi bacilli nei mezzi di nutrizione artificiali è abbastanza difficile, perchè è necessaria una temperatura piuttosto elevata e perchè si sviluppano assai lentamente: bisogna perciò disporre di un materiale di cultura assolutamente puro, altrimenti gli altri microbi, sviluppandosi più presto, rendono impossibile lo accrescimento di quelli tubercolari. Il Koch li ha coltivati per primo nel miscuglio di siero di sangue e gelatina, nel siero sanguigno sterilizzato e solidificato e nell'agar-agar. Nelle patate non si sviluppano, ed il miglior mezzo di nutrizione è il siero di sangue fatto solido col calore.

Per ottenere lo sviluppo dei bacilli contenuti nei tessuti, è necessario anzitutto che il materiale sia *fresco* e non contenga perciò i microbi della putrefazione, i quali si sviluppano assai rapidamente. Il miglior modo per riuscire nello intento è quello di prendere, con tutte le norme antisettiche già note, un nodicino tubercolare dall'interno del polmone o di una ghiandola linfatica, in cui esista il processo di caseificazione allo stadio iniziale, di schiacciarlo, per rendere liberi i bacilli che vi sono contenuti, fra 2 bistori precedentemente arroventati, di prenderlo coll'ansa di platino sterilizzata e depositarlo sulla superficie del siero colle cautele già esposte. Con tutto ciò, quando il materiale è tolto da cadaveri umani e non si può prender subito dopo la morte, le culture isolate riescono difficilmente. È più facile invece ottenerle da un animale reso tubercoloso coll'innesto e quindi ucciso.

I tubi col siero di sangue, innestati in tal guisa, si pongono nella stufa a 37° C.; e soltanto dopo 10-15 giorni le colonie dei bacilli tubercolari appaiono visibili all'occhio nudo. Se prima di questo tempo si vedono apparire sulla superficie del siero punti bianchi, che indicano lo sviluppo di microrganismi, è già un segno sicuro che sono state introdotte impurità e che la cultura non

riesce. Il primo apparire delle colonie dei bacilli tubercolari è segnato dalla presenza di punticini di un bianco opaco, non risplendenti, simili a piccole squamette, leggermente aderenti alla superficie del siero. Le singole squamette crescono poco in superficie, ma se sono abbondanti e si riuniscono, offrono l'aspetto di una pellicola sottile, bianco-grigiastra e non splendente.

Affatto caratteristico è l'aspetto di queste colonie, osservate al microscopio con un debole ingrandimento (80 diam. circa). Osservandolo infatti col microscopio, lo sviluppo delle colonie si rende naturalmente visibile prima che ad occhio non armato di lente, e già al 5° o 6° giorno dopo l'innesto si possono osservare le figure delicate e caratteristiche del primo sviluppo delle colonie; queste appaiono sotto forma di *linee sottili, ondeggiate, di cui le più piccole hanno per lo più la forma di una S,* mentre le colonie più lunghe offrono ripiegamenti e serpeggiamenti in tutti i sensi, cosicchè intrecciandosi acquistano un aspetto assolutamente caratteristico. L'estremità di queste linee è appuntita e nel mezzo sono rigonfiate leggermente a mo' di fuso. Per assicurarsi che si tratta realmente di colonie composte di soli bacilli tubercolari, basta colorirli col solito metodo ed osservarli ad ingrandimenti maggiori. Se si comprime un coproggetti contro la superficie del siero, su cui stanno le colonie in via di sviluppo, e poi si distacca, le colonie rimangono aderenti al vetrino conservando la loro figura; sicchè, disseccando il preparato e colorandolo, si possono vedere i bacilli situati per la maggior parte coll'asse maggiore parallelo alla lunghezza della colonia e separati gli uni dagli altri da una sostanza che li cementa.

I bacilli tubercolari non fluidificano il siero e non si sviluppano mai in profondità; la pellicola che formano alla superficie è resistente, ma si distacca, se si fa scorrere su questa il liquido che in generale si raccoglie nel fondo del tubo, contenente il siero solidificato. In queste culture, come nell'organismo animale, i bacilli tubercolari dopo un certo tempo producono spore.

I limiti di temperatura entro i quali è possibile la loro ve-

getazione sono, secondo le osservazioni del Koch, abbastanza ristretti: la temperatura più favorevole è di 37-38° C.; a 30° C. lo sviluppo è già stentato e cessa del tutto fra 28 e 29° C., come cessa egualmente a 42° C. Poggiandosi specialmente su questi fatti, il Koch ritiene che l'esistenza dei bacilli tubercolari sia possibile soltanto nell'organismo animale, e che questi sieno perciò *parassiti* puri e non anche *saprofiti*, come sono ad es. quelli del carbonchio; giacchè al difuori dell'organismo mancano per lo più, nei climi nostri almeno, le condizioni favorevoli pel loro sviluppo, ed è soltanto possibile che si mantengano in vita per mezzo delle spore.

Il Baumgarten (1) ha recentemente proposto, per ottenere le culture isolate dei bacilli tubercolari, di coltivarli nella camera anteriore dell'occhio dell'animale vivente. Si prende un nodicino tubercolare fresco e s'introduce colle dovute regole nella camera anteriore dell'occhio di un coniglio: dopo 8-14 giorni si vede già il nodicino ingrossato per lo sviluppo dei bacilli; si tira fuori allora, dopo 6-8 giorni, il nodo tubercolare dalla camera dell'occhio e se ne introduce un piccolo pezzetto nell'occhio di un 2° coniglio, e da questo in un 3°, finchè si ottiene una cultura netta quale si desidera. Questo processo avrebbe il vantaggio di non aver bisogno della stufa nè di tante norme di precauzione per evitare le impurità, giacchè la camera anteriore dell'occhio dell'animale vivente, pel fatto stesso della sua vitalità, non permette lo sviluppo degli ordinari microbi della putrefazione ed offre naturalmente la stessa temperatura della stufa.

Voglio accennare finalmente ad alcune avvertenze da avere, per evitare certe cause d'errore, in cui si può cadere nella pratica degl'innesti del materiale tubercolare negli animali. Anzitutto non si deve confondere la infezione artificiale col caso, facilmente possibile, di una tubercolosi spontanea, la quale negli animali che si adoperano d'ordinario per le esperienze (cavie e conigli) è abbastanza frequente. Si adopereranno perciò gli animali appena comperati, evitando di tenere nella stessa stalla gli animali tubercolosi e quelli sani e di mettere gli animali, inoculati col virus tubercolare, in località ove in precedenza ce ne sono stati altri ammalati di quella malattia. Il criterio più sicuro per fare la distinzione è il tempo che decorre dal momento dell'innesto a quello in cui l'animale muore, il quale nel caso di tubercolosi artificiale è in generale di 4-8 settimane: se supera i tre mesi, si può con molto fondamento sospettare il caso di una tubercolosi spontanea.

(1) Baumgarten, *Ueber ein neues Reinculturverfahren der Tuberkelbacillen*. Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1884, No. 22.

Un'altra causa d'errore può essere lo scambio dei nodi specifici con altri prodotti patologici consimili, ma non tubercolari; ma questo scambio si evita facilmente facendo la ricerca dei bacilli coi metodi già esposti, e provandone il potere infettante con innesti ulteriori negli animali.

Finalmente potrebbe anche accadere di produrre involontariamente l'infezione tubercolare col mezzo degli strumenti non bene puliti: e qui non posso che raccomandare di nuovo caldamente l'osservanza più scrupolosa delle regole di disinfezione delle mani e degli oggetti che si adoperano.

Per fare l'innesto del materiale tubercolare negli animali, si può scegliere l'occhio o il peritoneo, od anche semplicemente il tessuto sottocutaneo. Si scava sotto la cute di una cavia, o di un altro animale, colla punta delle forbici sterilizzate una saccoccia, profonda $^1/_2$ cent. e vi si spinge dentro un pezzetto di materiale da innesto grosso come un grano di miglio. Al giorno seguente la ferita è già rinchiusa e non vi si nota alcun segno di reazione. Dopo due settimane circa compare l'ingrossamento delle ghiandole vicine alla località dell'innesto, sulla quale si forma quindi una crosta secca, che ricopre un tumoretto molle e caseiforme. Gli animali dimagriscono progressivamente, finchè muoiono in generale fra la quarta e l'ottava settimana.

A lato del bacillo specifico fu dal Koch rinvenuto nello spessore delle caverne polmonari un altro microrganismo, che il Koch ha chiamato per la sua forma *micrococco tetragono* (Tav. 1ª fig. 7), il quale è stato coltivato isolatamente al difuori dell'organismo ed ha proprietà patogeniche. Cresce nella gelatina sotto forma di colonie sferiche, bianche, lungo tutto il percorso dell'ago di platino e non fluidifica la gelatina. Vegeta anche bene sulle patate.

Bacillo della lebbra.

Questi bacilli sono stati descritti esattamente la prima volta da Hansen nel 1868 e nel 1874 (1), ma furono in seguito stu-

(1) Hansen, Norsk Magazin for Laegevidenskaben, Christiania 1874.

diati più accuratamente dal Neisser (1), che li ha colorati per primo coi metodi di Weigert e di Koch (2), ed ha dimostrato che si trovano costantemente in tutte le manifestazioni morbose della lebbra, e stanno perciò con ogni probabilità in rapporto causale con questa malattia.

I bacilli della lebbra (Tav. 2ª fig. III. e IV) sono lunghi da 4-6 μ e larghi 1 μ e sono dotati di *movimenti spontanei* vivacissimi, sotto forma di movimenti oscillatori, simili a quelli dei bacilli della putrefazione nelle orine ammoniacali. Questa loro proprietà, che conservano anche quando sono contenuti entro le cellule, è abbastanza caratteristica ed ha anzi contribuito alla loro scoperta per parte dei primi osservatori. Per osservarla non si ha che dilacerare un piccolo pezzo di nodo lebbroso in una goccia d'acqua su di un coproggetti, ed esaminarlo quindi al microscopio a forte ingrandimento. I bacilli incolori appaiono un po' più larghi che nelle sezioni colorate: la maggior parte contengono 3-4 spore disposte nella direzione della lunghezza del bacillo, oppure ne hanno 2, una per ciascun polo. Talvolta bensì il numero e la disposizione delle spore nei singoli bastoncini è così diverso, da fare l'impressione in sulle prime di avere sott'occhio specie di bacilli differenti.

I microbi in discorso si trovano quasi sempre contenuti nell'interno delle cellule, che sono riunite sotto forma di nodi (nodi lebbrosi cutanei) nello spessore del derma, e solo raramente si osservano nella sostanza intercellulare. Il reticolo malpighiano coi suoi zaffi, le ghiandole sudorifiche ed il tessuto corneo non contengono bacilli. Questi sono stati trovati eziandio in tutte le neoproduzioni lebbrose, anche degli organi interni; si sono trovati nella mucosa della cavità orale e della laringe, nella milza, nel fegato, nei testicoli e nella cornea. Da alcuni sono stati osservati anche nel sangue. A questo riguardo bisogna notare che nella

---

(1) Neisser, *Weitere Beiträge zur Aetiologie der Lepra.* Virchow's Archiv Bd. 84, 1881.

(2) Koch, Lavoro citato.

forma cronica del male non è ancora bene accertato che il sangue contenga i bacilli; giacchè avvi il dubbio che, quando vi si trovarono, sieno stati spremuti fuori dai tessuti incisi nel fare la puntura. Invece nelle eruzioni acute della stessa malattia, accompagnate da febbre, è stata positivamente constatata la presenza dei bacilli nel sangue per opera anzitutto di Majocchi e Pellizzari, di Müller, De-Amicis e Köbner (1).

Hansen li ha per primo colorati con una soluzione acquosa di acido osmico; in seguito il Neisser nel 1879 li ha tinti coi colori d'anilina, ed il Koch (2) ha trovato che hanno lo stesso modo di colorazione caratteristica dei bacilli tubercolari. Si colorano bene col violetto di metile e con quello di genziana, ma meglio di tutto colla fucsina. Si è già visto che una maniera di comportarsi di questi bacilli verso i colori d'anilina a differenza di quelli tubercolari, nel senso ammesso dal Koch, non esiste, e che invece il Baumgarten ha trovato un metodo di colorazione differenziale, basato sulla proprietà che hanno i primi di colorarsi più rapidamente di quelli della tubercolosi.

I punti principali della diagnosi differenziale fra le due specie di bacilli sono i seguenti:

1° Il *metodo di colorazione*, quale è stato proposto da Baumgarten (Vedi pag. 130).

2° La *disposizione;* giacchè nei preparati essiccati, fatti col succo dei nodi lebbrosi, i bacilli sono quasi tutti contenuti entro le cellule, le quali talora ne sono tanto gremite, che riesce difficile vederli isolati: i bacilli della tubercolosi invece, nello sputo o nel contenuto delle caverne polmonari, sono sempre *liberi*. Però nelle sezioni questo carattere differenziale più non esiste, perchè anche questi ultimi, nelle sezioni di polmone ad es., sono contenuti nelle cellule e specialmente nelle cellule giganti.

---

(1) Köbner, *Uebertragungsversuche von Lepra auf Thiere*, Virchow's Archiv. Bd. 88, p. 282.

(2) Koch, Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. I, p. 10.

3° La *forma*. Il Koch ha notato che i bacilli della lebbra, visti cogli ingrandimenti più forti, appaiono colle estremità foggiate a punta, mentre i bacilli tubercolari le hanno arrotondate. Il Guttmann (1) nega invece l'esistenza di questa particolarità. Nei preparati da me osservati coll'obb. $^{1}/_{18}$, oc. 4 Zeiss ho potuto confermare, se non in tutti, in una gran parte almeno dei bacilli la forma appuntita descritta dal Koch (Tav. 2ª fig. IV).

4° Il carattere differenziale che ha più valore di tutti quanti finora accennati è quello *fisiologico*, che consiste in ciò che i bacilli della lebbra, inoculati negli animali, non si riproducono. Basta quindi inoculare nella camera anteriore dell'occhio di un coniglio un piccolo pezzetto di nodicino sospetto e, se si tratta di lebbra, si vedrà rimanere inalterato anche per mesi e l'animale conservare la salute perfetta; mentre invece, se il materiale introdotto è tubercolare, si otterrà la diffusione generale della malattia e la morte.

A tutto ciò si potranno forse aggiungere in prosieguo le caratteristiche speciali morfologiche delle colonie, sviluppantesi nei vari mezzi di nutrizione del Koch. Finora però è riuscito soltanto ad Hansen (2) di coltivare i bacilli lebbrosi nel siero di sangue solidificato, nel quale crescerebbero in maniera diversa da quelli della tubercolosi.

Per quel che riguarda l'*importanza patogenica* di questi bacilli, non v'ha dubbio ch'essi rappresentino la causa della malattia, dal momento che si trovano *costantemente*, in sì gran copia e sempre colle stesse proprietà fisiologiche e di forma in tutte le neoproduzioni lebbrose.

Questo si può affermare, per quanto sieno falliti finora i molteplici tentativi di innesto fatti negli animali, nei quali del resto non si è mai osservata, neppure spontanea, una forma simile di malattia. Le ricerche di

---

(1) Guttmann, Berl. med. Gesellschaft. Sitzung vom 10 Dec. 1884. Ref. in Deutsche med. Zeitung, No. 102, 22 Dec. 1884.

(2) Hansen, *Studien über Bacillus Lepræ*, Virchow's Archiv, Bd. 90, p. 547.

Köbner, di Hansen e di Damsch (1) dànno per risultato concorde la non trasmissibilità della lebbra agli animali, contrariamente a quanto avea asserito il Neisser, il quale nei cani in cui avea fatto l'impianto di nodi lebbrosi sotto la cute avea trovato, dopo 4-11 settimane, piccoli nodicini aventi tutti i caratteri delle neoformazioni anzidescritte. Egli ne avea concluso che gli elementi del tessuto innestato si erano riassorbiti, e che, sotto l'influenza dei bacilli contenutivi, si erano formati i nodi della cosidetta da lui « lebbra locale ».

Il Köbner invece ha dimostrato che quelli che Neisser avea preso per nodi neoformati non erano che i pezzi introdotti, conservati; giacchè in un animale, in cui avea inoculato il materiale lebbroso nella camera anteriore dell'occhio, trovò dopo *56 giorni* il tessuto introdotto inalterato ed i bacilli ben conservati e colorabili come d'ordinario.

Recentemente il Vossius (2) ha ripetuto le esperienze sui conigli, ed ha visto che, introducendo pezzi di lebbra tuberosa nella camera oculare anteriore di questi animali, succedeva in principio una moltiplicazione dei bacilli, i quali penetravano nel tessuto circostante dell'iride e della cornea, senza produrre però infiammazione nè fenomeni generali. Egli stesso ritiene che questa penetrazione dei bacilli nei tessuti anzidetti sia dovuta al fatto meccanico della formazione di vacuoli in seguito alla cherato-irite reattiva. Il Vossius ha pure osservato che i bacilli nei pezzi introdotti nell'occhio si mantengono vitali e capaci di sviluppo.

Più recentemente ancora, i D.ri Melcher e Ortmann (3) credono di avere realmente riprodotto con successo la malattia, avendo trovato in un coniglio, a cui aveano inoculato nell'occhio un pezzo di nodo lebbroso, morto 300 giorni dopo l'innesto, nei polmoni, nella pleura e nel pericardio una certa quantità di piccoli nodi neoformati, contenenti bacilli racchiusi nelle cellule. Essi affermano di avere differenziato questi bacilli da quelli tubercolari sia per la loro posizione intracellulare, come per la proprietà di colorarsi rapidamente col metodo di Baumgarten. Manca tuttavia il criterio della cultura isolata nei mezzi di nutrizione e quello della riproduzione negli animali, sicchè a questo caso isolato non mi sembra si possa dare per ora un grande valore.

Nieden in Norvegia e Mayer a Madera hanno fatto studi importanti e ricerche numerose su questa malattia, dalle quali risulterebbe che la stessa nella specie umana è bensì *ereditaria*, ma non è direttamente contagiosa. Avvi riferito un solo caso di una bambina che sembra averla contratta dalla nutrice. Anche gli innesti tentati sull'uomo dai medici a Funchal sono finora rimasti senza risultato.

---

(1) Damsch, *Uebertragungsversuche von Lepra auf Thiere*, Virchow's Archiv. Bd. 92.

(2) Vossius, *Uebertragungsversuche vom Lepra auf Kaninchen*, Berichte über Ophtalmologencongress su Heidelberg, Nov. 1884.

(3) Melcher u. Ortmann, *Uebertragung vom Lepra auf Kaninchen*, Berl. klin. Wochenschr. 1885, No. 13.

Bacillo tifoso di Eberth.

Il microparassita specifico del tifo addominale è stato descritto da Eberth (1) nel 1880, sotto forma di un bacillo corto e grosso, contenente spore, il quale si trova nel fegato, nei reni, nella milza, nelle ghiandole mesenteriche e nelle parti profonde non ulcerate della mucosa intestinale tumefatta. Anche il Klebs (2) ha descritto, quale specifica del tifo, un'altra forma di bacilli lunghi e sottili: ma questi, come ha osservato il Koch (3), si trovano soltanto sulla superficie ulcerata della mucosa ed hanno perciò un'importanza affatto secondaria, mentre i primi si trovano nelle parti profonde della mucosa stessa e negli organi interni.

L'Eberth ed il Koch aveano però constatato la presenza di questi bacilli soltanto nella metà dei casi presi in esame: Meyer (4) invece, ricercandoli più accuratamente sotto la direzione di Friedländer, potè trovarli quasi regolarmente e tanto più numerosi, quanto più recente era la data della malattia. Finalmente il Gaffky (5), di 28 casi che ha osservato, in due soltanto, decorsi assai rapidamente, non ha trovato alcun bacillo, ma negli altri li ha trovati costantemente negli organi interni anzidetti, per quanto però abbia dovuto fare talora più di 100 sezioni prima di rintracciare un ammasso dei bacilli caratteristici. Il D.re Hein (6) di Vienna li avrebbe anche osservati nel

---

(1) Eberth, *Die Organismen in den Organen bei Typhus abdominalis.* Virchow's Archiv, Bd. 81 (1880) e Bd. 83 (1881).

(2) Klebs, *Der Bacillus des Abdominaltyphus und der typhöse Process.* Archiv f. experim. Path. u. Pharm. Bd. XIII (1881).

(3) Koch, Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. I, p. 45.

(4) Meyer W., *Untersuchungen über den Bacillus des Abdominaltyphus*, Inaug-Dissert. Berlin, 1881.

(5) Gaffky, *Zur Aetiologie des Abdominaltyphus*, Mittheilungen, ecc., Bd. II, p. 372.

(6) Hein, *Typhusbacillen im Milzblute resp. Milzsafte.* Centralblatt f. d. med. Wissensch. 1884, p. 695.

succo della milza, estratto dal vivente colla siringa Pravaz: questo fatto, finora constatato in un caso soltanto, se si verificasse costantemente, potrebbe riuscire di grande vantaggio per stabilire sicuramente la diagnosi dei casi dubbi fin da principio.

Questi bacilli hanno una lunghezza variabile, ma per lo più sono lunghi 3-4 volte tanto che larghi, e talora si presentano anche sotto forma di filamenti: sono grossi e nell'interno dell'organismo la maggior parte contiene 2 o 3 grosse spore (Tav. II, fig. 7).

Nelle sezioni dei tessuti si colorano bene con qualunque sostanza basica di anilina ed anche coll'ematossilina: il Gaffky li ha colorati tenendo le sezioni per 44 ore nella soluzione di bleu di metilene. Si differenziano dai bacilli della putrefazione per ciò che si colorano assai più lentamente e soltanto nelle soluzioni concentrate.

Il Gaffky è riuscito per primo a coltivarli isolati sulla gelatina con infuso di carne, nella quale lo sviluppo delle colonie appare visibile già dopo 24-48 ore. Come caratteristica di questi bacilli coltivati in gelatina, il Gaffky ha osservato che sono dotati di vivaci movimenti proprî, non fluidificano la gelatina e crescono nell'interno e non in superficie. Sulle patate il modo loro di svilupparsi è ancor più caratteristico, giacchè la superficie di sezione delle stesse appare inalterata ed è soltanto come sporca, quando è già completamente coperta di bacilli, i quali in seguito costituiscono a poco a poco una specie di pellicola più resistente. In maniera analoga crescono pure sulla superficie del siero sanguigno solidificato.

Sulle patate a 37° C. sporificano dopo 3-4 giorni: la temperatura più favorevole alla formazione di spore oscilla fra 30-40° C.: a 20° C. solamente dopo 8 giorni comincia a comparire qualche spora isolata, ed al disotto di 20° non se ne formano più.

I tentativi di innesto dei bacilli tifosi nei vari animali (conigli, cavie, topi, ratti, polli, vitelli, scimmie) non hanno avuto finora alcun risultato positivo. Tuttavia stando al loro modo speciale e caratteristico di crescere nei mezzi solidi di nutrizione, alla loro differenza dai bacilli della putrefazione, e basan-

dosi finalmente sul fatto della loro presenza quasi costante nei casi di tifo nell'interno degli organi anzidetti, e della mancanza invece degli stessi nei cadaveri di individui morti per altre malattie, si può con ogni probabilità ammettere che i bacilli in discorso sieno realmente i produttori delle alterazioni morbose del « tifo addominale ».

Il punto di partenza di questi bacilli è senza dubbio l'intestino, giacchè nei casi recenti si trovano in gran copia nella mucosa intestinale e non si trovano ancora nell'interno degli organi. Il veicolo che li introduce nel nostro organismo nella maggior parte dei casi è l'acqua che beviamo, come lo dimostrano le osservazioni numerose, fatte in vari luoghi, di epidemie che hanno avuto il loro punto di partenza, ad es., dall'acqua di un pozzo inquinata dalle deiezioni d'un tifoso (Gaffky, Ramdohr).

Bacillo del moccio (morva o farcino).

L'identità patologica di questa malattia in alcuni animali domestici (cavallo e pecora specialmente) e nell'uomo era stata già dimostrata nel 1839 da Rayer, il quale avea inoculato con successo negli animali il pus proveniente da un tumore moccioso dell'uomo. Il merito però di avere dimostrato la natura veramente parassitaria della malattia è dovuto a Löffler e Schütz (1), i quali trovarono nelle sezioni dei nodi mocciosi del polmone, del fegato, della milza, delle ghiandole linfatiche, dell'ovario, dei testicoli e dei tumori della mucosa nasale una forma soltanto di bacilli, delicati, grandi all'incirca come quelli della tubercolosi e facilmente colorabili colla soluzione alcalina concentrata di bleu di metilene. (V. Cap. III). Israel dice che si colorano eziandio col violetto di metile o di genziana. È da notare però che talora i

(1) Struck, *Vorläufige Mittheilungen über die Arbeiten welche zur Entdeckung des Bacillus der Rotzkrankheit geführt haben*, Deutsche med. Wochenschr. 23 Dec. 1882.

bacilli sono scarsi e si vedono difficilmente: è necessario sempre di ricercarli coll'immersione omogenea e coll'apparecchio di Abbe.

Riguardo alla *forma* ed alla *grandezza* di questi bacilli sono state fatte recentemente ricerche da Weichselbaum (1), dalle quali risulta che tali proprietà morfologiche variano alquanto secondo il periodo di sviluppo dei bacilli stessi. In principio questi appaiono delicati e sottili come quelli tubercolari, e si colorano uniformemente col bleu di metilene e col violetto di genziana: in seguito si fanno più grossi, e nel loro interno compaiono alcuni punti chiari, non suscettibili di colorazione, che avrebbero il significato di spore. Finalmente in uno stadio più avanzato di sviluppo i bacilli si colorano assai debolmente col bleu di metilene, prendendo un aspetto decisamente granuloso, mentre si colorano ancora bene col violetto di genziana. Nelle culture mantenute a 37-38° C. si osservano talora filamenti, aventi una lunghezza 5-6 volte maggiore di quella dei singoli bacilli.

Questi bacilli sono stati ottenuti anche in cultura isolata sul siero di sangue solidificato, ove si sviluppano a 37° C. dopo tre giorni, in principio sotto forma di goccioline trasparenti, le quali in seguito diventano biancogrigiastre e viscose. Nella gelatina crescono sotto forma di masse bianche, filamentose e ripiegate, che fluidificano la gelatina stessa; crescono benissimo sulle patate, sotto forma di accumuli giallo-biancastri caratteristici, i quali col tempo si fanno sempre più scuri.

Gli innesti fatti colle culture nette di questi bacilli hanno riprodotto l'imagine tipica della malattia nei cavalli, nelle cavie, nei conigli (non sempre), nei topi campagnuoli e nei cani.

Tali risultati furono poi confermati da osservazioni ulteriori di Israel (2), di Wassilieff (3) e di altri. Bisogna notare che

---

(1) Weichselbaum, *Zur Aetiologie d. Rotzkrankheit d. Menschen*, Viener med. Wochenschr. 1885 No. 21 e seg.

(2) Israel, *Ueber die Bacillen der Rotzkrankheit*. Berl. klin. Wochenschr. 1883, No 11.

(3) Wassilieff, *Die Bacillen des Rotzes und ihre Bedeutung für die Diagnose*, Deutsche med. Wochenschrift. 1883, No. 11.

il reperto di questi bacilli nel muco nasale non può servire per stabilire la diagnosi della malattia, non conoscendosi finora un metodo di colorazione speciale che li differenzi dalle altre specie di bacilli.

Molkentin (1) per stabilire il diagnostico differenziale della morva nei cavalli, che talora è assai difficile, ha proposto di usare l'innesto del virus sospetto nei cani, i quali, specialmente se giovani, sono sensibilissimi per questa malattia e inoculati ammalano sempre.

Grünwald (2) conferma di avere anche egli tentato con successo, per lo stesso scopo, l'innesto nei cani del muco nasale di animali affetti da morva.

Bacillo della setticemia dei topi.

Questi bacilli sono piccolissimi; hanno una lunghezza di 0,8-1,0 μ ed uno spessore di 0,1-0,2 μ, sono per lo più isolati o riuniti a due a due, o raramente a quattro; non formano mai filamenti e talora producono spore. — Non hanno movimenti propri e si trovano per lo più nei liquidi in putrefazione, donde sono stati isolati la prima volta dal Koch (3). Basta iniettare nei topi bianchi una piccola quantità di un liquido putrefatto, per vederli morire con questa forma di setticemia bacillare dopo 40-60 ore. Alla sezione non si trova, all'infuori di un leggero grado di edema attorno al punto di innesto e di una notevole tumefazione della milza, nessun altro segno di alterazioni apparenti. Nel tessuto sottocutaneo, tutto all'intorno della località innestata ed anche lontano da questa, si trovano numerosi i bacilli caratteristici: questi si trovano inoltre sparsi in gran copia in tutto l'albero vascolare sanguigno, tanto nei grossi vasi come nei capillari di tutto il corpo, e stanno specialmente racchiusi entro i corpuscoli bianchi, dove si moltiplicano talora in quantità così grande, che il corpuscolo si trasforma in un ammasso di bacilli rotondeggiante. Basta una piccolissima quantità del sangue di un topo infetto per riprodurre la malattia in un altro animale.

I topi di campagna hanno l'immunità naturale per questa malattia, le passere invece la contraggono facilmente coll'innesto. Innestando questi bacilli

---

(1) Molkentin, *Ein Beitrag zur Sicherstellung der Diagnose des occulten Rotzes*, Inaug.-Dissert., Dorpat 1883.

(2) Grünwald, *Zur Differential-Diagnose des Rotzes*, Oestr. Monatsschr. f. Thierheilkunde 1884, No. 4 u. folg.

(3) Koch, Wundinfectionskrankheiten, etc.

nell'orecchio di un coniglio, si vede insorgere un processo risipelatoso locale, a decorso caratteristico, ed innestandoli nella cornea si produce un' infiammazione viva dell' occhio. Gli animali una volta inoculati, acquistano poi l'immunità verso gli innesti successivi dello stesso materiale.

I bacilli della setticemia dei topi si coltivano facilmente nella gelatina preparata coll' umore acqueo di vitello o coll' infuso di carne e peptone, e formano nell'interno di questa una specie di nubecola, formata da finissimi filamenti ramificati, radianti da un punto centrale, assumendo un aspetto assolutamente caratteristico. Non fluidificano la gelatina. Non crescono sulle patate.

Bacillo nella difterite dell'uomo.

Il Löffler (1) ha osservato in 29 casi di difterite due forme di microrganismi patogeni: *a)* un micrococco sotto forma di catena, a cui egli attribuisce un'importanza affatto secondaria, *b)* un *bacillo* speciale, lungo all' incirca come quello della tubercolosi, ma due volte più spesso, ora diritto ed ora invece leggermente ricurvo, colle estremità rigonfiate e non sporigeno, il quale si colora intensamente col bleu di metilene. Questo bacillo sembra essere identico a quello già dimostrato dal Klebs nella stessa malattia al congresso di Wiesbaden nel 1883. Si trova nelle parti più antiche e più profonde delle membrane difteriche, ma non si trova mai negli organi interni, ed è stato osservato da Löffler in 13 casi di malattia veramente caratteristica. Non si sviluppa nè sulle patate, nè sulla gelatina, ma cresce bene sulla superficie del siero solidificato a 37° C., sotto forma di punti bianchi rotondi, che presto confluiscono e ricoprono tutta la superficie del siero. A 60° C. muore e al disotto di 20° C. non si sviluppa. Il mezzo più acconcio pel suo sviluppo è composto da 3 parti di siero di sangue di agnello, o di vitello, a cui si aggiunge 1 parte di brodo di carne di vitello, contenente 1 °/₀ di peptone, 1 % di zucchero d' uva e $^1/_2$ °/₀ di sale di cucina.

Innestando il prodotto di queste culture isolate sotto la cute

(1) Löffler, *Untersuchungen über die Bedeutung*, ecc. Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. II, p. 421 e seg.

delle cavie o di piccoli uccelli, questi animali muoiono in pochi giorni con un'infiltrazione biancastra, emorragica nel punto d'innesto e con infiltrazione edematoso-emorragica del tessuto sottocutaneo e della pleura. Inoculati nella trachea dei polli, dei piccioni e dei conigli, vi producono una grave infiammazione con formazione di pseudomembrane, quali si formano anche sulla vagina delle cavie scarificata. In queste pseudomembrane però il Löffler non ha trovato che scarsi i bacilli, i quali non si rinvennero neanche nell'interno degli organi degli animali inoculati, come del resto non si trovano nell'interno dell'organismo umano, colpito dalla stessa malattia. Questi bacilli hanno adunque sugli animali la stessa azione che ha sull'uomo il virus difterico, col quale hanno anche in comune il fatto, che gli animali giovani soccombono all'innesto di quelli più facilmente ed in maniera più rapida che i vecchi.

Cionostante però non si può dire con certezza che tali microbi costituiscano la causa della difterite nell'uomo; giacchè anzitutto il reperto degli stessi, anche nei casi tipici di difterite, non è costante, ed inoltre perchè, posti sulle mucose *intatte* degli animali, non vi producono alcun' alterazione, mentre d'altronde fu trovata una forma, biologicamente uguale a quella descritta, nella bocca di un bambino perfettamente sano. — Il Löffler ha fatto anche ricerche sulla difterite dei piccioni e dei vitelli, ed ha trovato anche qui, come elemento specifico, una forma speciale di bacillo.

Il processo di colorazione di questi microrganismi è uguale a quello già esposto pei bacilli del moccio.

Bacillo del « Mal rosso » dei suini.

Come agente specifico di quella malattia infettiva dei suini, nota sotto i nomi diversi di *risipola maligna*, *pneumoenterite*, *mal rosso*, ecc., il Klein (1) ha descritto un bacillo assai corto, lungo 1.5 μ circa, coll'estremità

---

(1) Klein, *Report on infectious Pneumoenteritis of the Pig*, in Rep. of the Medic. Offic. of the Privy Council 1877-78. — Lo stesso, *Die Bacterien der Schweineseuche*, Virch. Arch. Bd. 95, p. 468.

arrotondante, il quale nei mezzi di coltivazione artificiali cresce in forma di filamenti, contenenti spore di 0,5 μ di spessore. Il Pasteur (1) invece afferma che il microparassita, che si trova nei casi di questa malattia, è un diplococco colla forma solita di otto in cifra, simile a quello del colèra dei polli.

Il Klein ha trovato costantemente questa forma di bacilli nel contenuto bronchiale, nelle parti di polmone ammalate, nelle ghiandole inguinali e peritoneali tumefatte, nell'essudato peritoneale e nella mucosa e sottomucosa infiammata dell'intestino dei maiali morti di tal malattia. Nel sangue li ha trovati, ma non sempre. Si colorano con tutti i colori ordinari d'anilina, ma preferibilmente colla fucsina. Il Klein ne ha fatto culture nei mezzi di nutrizione solidi e liquidi, e cogli innesti di questi bacilli, coltivati fino alla 5ª generazione, ha riprodotto la stessa forma morbosa nei suini, nei conigli e nei topi, constatando la presenza dei bacilli stessi nel sangue, nella milza, nel fegato e nei polmoni degli animali immolati.

Il Pasteur (2), come si è già detto a proposito dell'attenuazione artificiale dei virus, ha osservato che innestando i microbi del mal rosso in molti conigli, da uno all'altro successivamente, mentre aumenta in maniera progressiva la loro virulenza verso questi animali, diminuisce invece nella stessa proporzione il potere infettante degli stessi verso i suini; cosicchè ad un certo punto non producono più in questi ultimi che una forma leggerissima di malattia, e conferiscono loro inoltre l'immunità dalle forme più gravi. Il Pasteur ha visto infatti che, durante un'epidemia di questo male, i maiali innestati col virus attenuato nel modo anzidetto non si sono ammalati. Manca però ancora la prova diretta ed assoluta di questa immunità, giacchè nè il Pasteur nè il Klein hanno provato se i maiali, trattati col virus attenuato, addivengono refrattari anche all'innesto fatto col materiale infettante, preso da altri suini morti per la stessa malattia.

Altre forme di bacilli, dei quali però non è ancora completamente stabilita l'importanza patogenica, sono il *bacillo della malaria*, che sarebbe stato trovato da Klebs e da Tommasi-Crudeli nel terreno dei luoghi ove domina il miasma palustre, e quello *della sifilide*, descritto una prima volta da Klebs (3) e negato quindi da Ziegler e da altri, ed ora nuovamente messo in luce da Lustgarten, il quale dice di aver trovato per questo bacillo un processo speciale di colorazione.

---

(1) Pasteur, Comptes-rendus, 22 nov. e 23 Dec. 1883.
(2) Pasteur, *Die Schutzimpfung gegen den Schweinerothlauf*, Fortschr. d. Med. 1884, No. 1.
(3) Klebs, Archiv f. experim. Path. Bd. X.

Del bacillo della malaria non parliamo, perchè l'osservazione anzidetta non ha ricevuto finora alcuna conferma positiva.

Il *bacillo della sifilide* è stato ora descritto da Lustgarten (1), nell'interno delle neoformazioni sifilitiche, in 16 casi di sifilide da lui esaminati (2 sclerosi, 1 ghiandola linfatica, 3 papule, 4 gomme ed il cosidetto secreto di 3 sclerosi e di 3 papule umide). Questi bacilli, simili per le proprietà morfologiche e di colorazione a quelli della lebbra e della tubercolosi, lunghi da 3,5 - 4,5 μ e larghi da $^1/_4 - ^1/_{10}$ μ, diritti o ripiegati, hanno superficie disuguale e contengono da 2-4 spore ovali per ciascuno. Non sono liberi, ma contenuti entro le cellule, in numero di 2-9 ed anche di più: nelle papule si trovano abbondanti nel reticolo malpighiano, ed in un caso di sclerosi sono stati osservati entro un vaso linfatico. — Il numero di questi bacilli nelle neoformazioni sifilitiche sarebbe vario, ed in generale non molto abbondante. Più abbondanti invece si troverebbero nel liquido patologico proveniente dalle stesse neoproduzioni, per cui il loro reperto avrebbe anche valore per la diagnosi.

Il processo usato da Lustgarten è il seguente:

Le sezioni dei pezzi indurati nell'alcool si lasciano per 12-24 ore nel liquido di Ehrlich; si lavano quindi nell'alcool e si portano in una soluzione di permanganato di potassa a 1 $^1/_2$ $^0/_0$, ove si lasciano per circa 10 secondi, formandosi un precipitato di perossido di manganese che si deposita sulle sezioni; si immergono allora in una soluzione acquosa di acido solforoso puro, per un tempo variabile secondo il grado di concentrazione della stessa, finchè si sono liberate dal perossido di manganese, si lavano quindi nell'acqua e si immergono di nuovo nella soluzione di permanganato e da qui nell' acido solforoso, ripetendo l' operazione un certo numero di volte (in generale 3-4 volte), finchè le sezioni appaiono incolore. Allora si disidratano, si rischiarano e si chiudono in balsamo. I preparati sui coproggetti si trattano egualmente.

---

(1) Lustgarten, Wiener medicinische Wochenschrift, 1884 No. 47, e 1885 No. 17.

Questo modo di colorazione sarebbe comune ai soli bacilli tubercolari e lebbrosi, e non a tutto il resto dei microparassiti: ciononostante potrebbero i bacilli in discórso venir differenziati anche dagli anzidetti, perciò che si decolorano coll'acido nitrico ed idroclorico, a differenza di quelli della lebbra e della tubercolosi.

Che i bacilli descritti da Lustgarten sieno veramente gli specifici della sifilide, resta tuttavia ancora da dimostrarsi colle culture isolate e cogli esperimenti d'innesto fatti colle stesse.

Batterio della setticemia dei conigli.

Il Koch ed il Gaffky (1), iniettando nei conigli l'acqua putrida e puzzolente di un piccolo fiume (Pankevasser) che scorre in Berlino, affluente della Sprea, osservarono che questi animali morivano dopo poche ore coi sintomi di una malattia altamente infettiva, caratterizzata anzitutto da elevazione della temperatura del corpo, da dispnea (10-12 ore dopo l'innesto) e quindi da abbassamento della temperatura, fino al disotto del normale, e da alcuni accessi convulsivi che terminavano colla morte (16-20 ore dall'innesto). Alla necroscopia si trovano la milza e le ghiandole linfatiche tumefatte ed i polmoni distintamente marmorizzati, senza nessuna traccia di infiammazione nè alla pleura nè al peritoneo. Nel sangue si osservano abbondanti i microbi specifici, sotto forma di bastoncini corti, colle estremità leggermente acuminate: trattati coi metodi di colorazione ordinaria, mostrano nel mezzo un tratto non colorato, in modo da prendere l'aspetto di due micrococchi posti vicini l'uno all'altro, senza però avere nel mezzo un vero strozzamento. Sono lunghi 14 μ e larghi da 0,6-0,7 μ. Se sono riuniti a due a due, assumono l'aspetto di *otto* in cifra; talora se ne trovano riuniti parecchi in forma di filamenti, e sono circondati da un alone più chiaro. Non hanno movimenti propri.

Questi batteri sono patogeni anche per i topi, per i polli e per i passeri: non lo sono invece per le cavie e per i cani.

Crescono assai facilmente nei mezzi di nutrizione più svariati.

Non pare però che si trovino sparsi dappertutto, poichè nelle sostanze in putrefazione non furono mai trovati, ed il Koch li rinvenne soltanto in quell'acqua di Berlino ed una volta nel liquido di salame putrefatto.

Si crede che questo batterio sia identico a quello descritto da Raynaud e Lannelongue e quindi da Pasteur, come specifico di una forma di setticemia, prodotta nei conigli coll'innesto della saliva di un bambino morto

---

(1) Koch u. Gaffky, Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. I, p. 102.

d' idrofobia. Difatti la descrizione di questa forma morbosa, che venne dapprima designata senz'altro col nome di « rage » e quindi semplicemente con quello di « maladie nouvelle », collima perfettamente col quadro anzidescritto e colla malattia che si ottiene inoculando nei conigli la saliva degli individui normali, anche a riguardo delle proprietà morfologiche del microbo specifico.

Batterio del colèra dei polli.

Un altro batterio patogeno è quello descritto anzitutto dal Perroncito, e quindi da Toussaint e da Pasteur come specifico del cosidetto *colèra* o *tifoide dei polli*, e che si trova abbondante nel sangue degli animali morti per tale malattia. Questo microparassita ha la forma di bastoncino molto corto, immobile, leggermente strozzato nel mezzo ed appartenente alla categoria degli aerobi. Le galline (o colombi, oche, anitre) inoculati con questo virus hanno diarrea profusa ed appaiono estremamente abbattuti, colle ali penzoloni, ed in preda ad una sonnolenza invincibile. La morte li colpisce in poche ore. La caratteristica del reperto necroscopico è un'enterite emorragica del duodeno. Il sangue di questi animali possiede proprietà altamente infettanti. Con ogni probabilità questa malattia non è che una varietà di setticemia e non ha perciò alcun interesse speciale.

Questo microbo si coltiva facilmente al difuori dell' organismo, sia nel brodo di pollo neutralizzato come nella gelatina. Le culture fatte nel brodo di pollo dopo un certo tempo subiscono, secondo le osservazioni del Pasteur, un' attenuazione del loro potere infettante, ed innestate nei polli producono in questi soltanto una forma leggera del male che non li uccide, ma li rende invece *immuni* dagli innesti ulteriori.

Spirochete del tifo ricorrente.

Questa forma speciale di microparassita è stata scoperta da Obermeier (1) nel sangue degli individui affetti da « febbre ricorrente » durante l' accesso. Si presenta sotto forma di filamenti ondulati (Fig. I, *h*, pag. 9), lunghi da 16-40 μ, mobilissimi, provvisti di ciglia terminali. Si trovano solamente nel sangue e soltanto durante l'accesso febbrile: negli intervalli da uno all'altro

---

(1) Obermeier, Med. Centralblatt 1873. — Berl. klin. Wochenschr. 1873, p. 151 e 391.

accesso non si trovano, se non tutt'al più per due giorni ancora dopo cessata la febbre.

Gli spirocheti si colorano bene col bruno di Bismarck, col violetto di metile e coll'azzurro di metilene.

Il Carter (1) ed il Koch sono riusciti, inoculando nelle scimmie il sangue contenente questi elementi parassitari, a riprodurre la malattia caratteristica, trovando pure nel sangue degli animali, uccisi nell'acme della malattia, numerosi gli spirocheti. Con ogni probabilità adunque questi sono da considerarsi quali elementi produttori dell'infezione, per quanto non sia riuscito finora di coltivarli al difuori dell'organismo animale. Sono ignote perciò le caratteristiche del loro sviluppo e la loro dimora fuori del sangue; non si sa neppure ove si vadano a nascondere i supposti germi, durante l'apiressia.

Spirochete boccale.

È lungo da 10-20 μ, colle estremità appuntite, assai simile al precedente, ma più sottile e più delicato; si trova spesso nel secreto della cavità della bocca e del naso, specialmente nella patina dentaria e nel contenuto dei denti cariati, unitamente al « leptotrix buccalis ». Dalle osservazioni di Miller (2) risulterebbe che questi due microrganismi, i quali si trovano nell'interno dei canalicoli dentari dei denti cariati, hanno importanza per la produzione della carie stessa, penetrando nel dente dopo che sia avvenuta la decalcificazione dello smalto per opera degli acidi, che si formano per la decomposizione dei residui delle sostanze alimentari.

---

(1) Carter, Deutsch. med. Wochenschr. 1879, No. 16 e 25.

(2) Miller, *Gährungsvorgänge im menschl. Munde ecc.* Deutsche med. Wochenschr. 1884, No. 36. — *Ueber die Caries der Zähne.* Correspondenzblatt für Zahnärzte, 1884.

Vibrione colerigeno.

Scoperto dal Koch, il quale nel 1883 lo trovò costantemente nell'interno dei cadaveri di colerosi, da lui sezionati in Alessandria d'Egitto e quindi nelle Indie, questa forma di microparassita è stata più tardi ottenuta in cultura isolata ed innestata anche negli animali con risultato positivo; tanto che si può affermare oggidì che la causa del *colèra asiatico* risiede nello sviluppo di questo parassita nel nostro organismo.

Questi microbi, chiamati dal Koch (1) per la loro forma speciale ricurva « Kommabacillus » (Tav. II, fig. 5), sono lunghi la metà o i $^{2}/_{3}$ circa dei bacilli tubercolari, ma sono più grossi e leggermente ripiegati a mo' di una virgola. Talora due individui si trovano ravvicinati nello stesso senso ed appaiono sotto forma di un semicerchio, oppure sono riuniti in senso inverso ed hanno l'aspetto di una *S*. Nelle culture assumono però un altro aspetto caratteristico di *filamenti* ripiegati a spirale, molto somiglianti agli spirocheti della febbre ricorrente. Per questo stadio speciale di sviluppo sarebbero da porsi fra gli spirilli, ma siccome poi si segmentano e la forma di lunghe spirali non risulta che dalla riunione di parecchi individui (come i filamenti, cosidetti di « leptotrix », nello sviluppo dei bacilli), così m'è parso più opportuno chiamarli semplicemente « vibrioni ». Non si è finora osservato in questi formazione di spore, nè alcun'altra *forma durevole* equivalente, atta a preservare la vita della specie dalle influenze esterne nocive. Basta infatti il *disseccamento,* prolungato per un'ora, per uccidere sicuramente il prodotto delle culture di questi microbi.

Vegetano assai bene come saprofiti nei mezzi di nutrizione più svariati, quali sono il brodo alcalino, il latte, il siero san-

---

(1) Koch, *Die Conferenz zur Erörterung der Cholerafrage.* Deutsche med. Wochenschr. No. 32, 1884.

guigno solidificato, la gelatina, l'agar-agar e le patate. Ponendo una goccia di brodo, contenente i vibrioni colerigeni, in un vetrino e rovesciandolo sopra un portoggetti incavato, si vede che sono mobilissimi ed offrono ai margini della goccia un aspetto caratteristico. Nel *latte* si sviluppano rapidamente, senza alterarne per nulla le proprietà macroscopiche.

Ma il mezzo più adatto pel loro sviluppo, dove le colonie assumono un'apparenza veramente caratteristica, è *la gelatina nutritiva leggermente alcalina.* Mantenendo i tubi a 20-22° C., già dopo 24 ore le colonie appaiono, lungo il percorso dell'ago di platino, sotto forma di piccole goccioline a contorni irregolari, di aspetto granuloso, come se fossero formate da un ammasso di corpicciuoli splendenti, e d'una tinta giallo-rosea leggera. Progredendo lo sviluppo, la gelatina si fluidifica all'ingiro lentamente, mentre la cultura tende ad approfondarsi a poco a poco, in modo da assumere l'aspetto di un *imbuto*, nell'apice del quale si vede la colonia sotto forma di un punto biancastro. Questo modo di crescere nella gelatina è speciale del vibrione colerigeno.

Un' altra caratteristica dello sviluppo in gelatina si ha osservando al microscopio con debole ingrandimento le culture sulle lastre di vetro, ove si vedono i margini delle colonie *dentellati*, anzichè lisci come d'ordinario, e la colonia stessa imbutiforme e come se fosse composta di vetro polverizzato. La fluidificazione della gelatina procede lentamente e le singole colonie hanno la dimensione di 1 mm. circa. — Anche dopo 5-6 giorni non si ha mai sviluppo di gaz odorosi, ma solamente un odore leggermente urinoso ed aromatico. L'agar-agar non viene fluidificato dallo sviluppo di queste colonie.

Non crescono sulla gelatina che reagisce acida, anche debolmente, e si sviluppano invece sulle patate, che hanno pure reazione acida, ma soltanto a temperatura più elevata che non sulla gelatina. Sulle patate alla temperatura dell' ambiente non si sviluppano, ma a 30° C. vi crescono rapidamente sotto forma di uno strato sottile *giallo-scuro*, simile alle colonie dei bacilli del moccio, forse soltanto un poco più chiaro.

La temperatura più favorevole allo sviluppo di questo microbo oscilla fra 30-40° C.; a 17° l'accrescimento si fa già più lento e a 16° cessa del tutto, come avviene pel bacillo del carbonchio. A 70-80° C. muore; raffreddato invece fino a-10° C., si mantiene ancora in vita. — Per crescere ha bisogno dell'ossigeno, è aerobio; nelle culture fatte nei portoggetti incavati, chiusi col coproggetti, e nell'atmosfera di CO^2 lo sviluppo si arresta, ma non cessa la vita. — È sensibilissimo all'azione di certi acidi; dico così perchè cresce sulle patate, che sono pure debolmente acide. Egualmente molto sensibile è pel disseccamento; se non è in un mezzo umido, muore rapidamente. Nel corpo dell'uomo vivente, nelle deiezioni, nella biancheria, nell'intestino dei cadaveri non ha che un'esistenza di breve durata. Nell'acqua distillata, secondo le osservazioni di Babes (1), muore presto; secondo quelle di Nicati e Rietsch (2) invece dura in vita 20 giorni circa. Nell'acqua fluviale però ed in quella dei condotti si mantiene in vita 7 giorni ed anche di più, nell'acqua dei pozzi 30 giorni; nell'acqua del porto di Marsiglia i microbi rimasero in vita persino 81 giorni. L'acqua è adunque un mezzo assai favorevole di conservazione del parassita colerigeno, e l'acqua salata anche più di quella dolce.

Il luogo di sviluppo del parassita nell'organismo umano è semplicemente l'intestino, giacchè finora non si sono trovati nell'interno degli organi, nè tampoco nel sangue. Secondo le osservazioni del Koch penetrano pure nell'interno dello spessore della mucosa e nei follicoli solitari.

Lo sviluppo dei microbi colerigeni è rapidissimo, ma la parabola della loro vita si svolge anche con altrettanta rapidità: la loro vegetazione raggiunge ben presto un massimo, resta stazionaria per un poco e quindi decresce finchè si spegne. Mesco-

---

(1) Babes, *Untersuchungen über Koch's Kommabacillen*. Virchow's Archiv, Bd. 99, I. Heft.

(2) Nicati et Rietsch, *La vitalité du microbe du Cholèra*. Revue scientifique, N. 9, 1885.

lando le sostanze, che li contengono commisti ad altre forme di microrganismi, ad es. le deiezioni alvine dei colerosi, colla terra umida e distendendola su di un pezzo di tela mantenuto umido, si ottiene dopo 44 ore una cultura netta dei vibrioni in discorso, giacchè vincono nella concorrenza gli altri microbi: dopo 2-3 giorni però cominciano già a morire, e gli altri microrganismi prendono il sopravvento. Lo stesso avviene nell'intestino dell'uomo ammalato, ove i vibrioni specifici si trovano soltanto nei primi stadi del male, specialmente nel periodo delle scariche alvine scolorate e risiformi.

Nei cadaveri dei colerosi è raro trovarli al di là dell'undecimo giorno; per lo più dopo il 5° o 6° giorno di malattia scompaiono. Nelle deiezioni lasciate a sè muoiono e scompaiono egualmente fra il 3° ed il 6° giorno. Il Koch ritiene che il loro sviluppo sia incompatibile con quello dei microbi della putrefazione, per cui crede che le feci gettate nelle latrine non sieno così pericolose come generalmente si ritiene. Noto bensì che questa è un'opinione non ancora positivamente dimostrata. Il Koch avrebbe soltanto osservato che nel contenuto di una latrina i vibrioni colerigeni erano scomparsi dopo 24 ore.

I principali agenti che servono ad impedire lo sviluppo di questi esseri, oltre il disseccamento, come è stato già esposto, sono, secondo il Koch, l'acido fenico in soluzione di 1:400, il solfato di rame 1 : 2,500, il chinino 1 : 5,000 ed il sublimato 1 : 100,000. È da notare che il solfato di ferro, che si vede così generalmente raccomandato per le disinfezioni, non impedisce lo sviluppo dei vibrioni colerigeni, se non quando si aggiunge al liquido di nutrizione degli stessi in proporzione del 2 %, e tuttavia non li uccide; sicchè gettandolo nelle latrine, può essere anzi che impedisca la putrefazione e favorisca così il mantenersi in vita dei microbi specifici.

Il Koch ha prodotto eziandio la prova negativa della specificità dei vibrioni colerigeni, giacchè oltre il provare che si trovano costantemente (in certi periodi ben inteso) nei cadaveri dei colerosi, ha esaminato un gran numero di cadaveri di altre ma-

lattie, e le scariche alvine di altri individui malati e quelle dei sani, e non ha mai trovato in nessun caso una forma simile a questa finora descritta.

In quanto alle prove d'innesto fatte sugli animali, tralascio di parlare dei tentativi fatti da Thiersch e da altri, già da tempo, facendo ingerire agli animali le deiezioni colerose; dirò soltanto che recentemente Rietsch e Nicati hanno anzitutto iniettato direttamente nel duodeno dei cani il prodotto delle culture nette dei vibrioni, previa legatura del coledoco, ed hanno visto riprodursi la sindrome fenomenica del colèra, con abbondante sviluppo dei microbi specifici nell'intestino.

In seguito il Koch (1) ha ripetuto l'esperienza nei conigli e nelle cavie senza legatura del coledoco, diluendo la cultura netta in guisa, che la quantità di liquido iniettato non contenesse che una centesima parte d'una goccia del liquido di cultura. Gli animali sono morti da 36 ore a 3 giorni dopo l'innesto coi fenomeni del colèra, e nel contenuto intestinale del tenue si trovarono numerosissimi i microbi caratteristici. — Tali risultati sono stati confermati anche dalle osservazioni di Babes e di Van Ermengen (2).

Più recentemente ancora lo stesso Koch (3) afferma di aver riprodotto la malattia in 85 cavie, mediante l'iniezione stomacale della cultura netta dei microbi nel brodo, preparando però in antecedenza l'animale come segue. Si iniettano nello stomaco dell'animale 5 ccm. di soluzione di soda al 5 °/₀, e dopo 40 minuti, si iniettano 10 ccm. di brodo di carne, contenente i vibrioni allo stato di cultura isolata; immediatamente dopo si fa nel cavo peritoneale un'iniezione di tintura d'oppio, nella proporzione di 1 ccm. per ogni 200 gr. di peso dell'animale. Questi si narco-

(1) Koch, *Ueber die Cholerabacterien*, Deutsche med. Wochenschr. 1884, No. 45.

(2) Van Ermengem, Bull. de la Soc. de Micr. belge, N. 1 e 2, 1884 e N. 3, 1885.

(3) Koch, Vorläuf. Mitth. über d. zweite Serie von Sitzungen der Cholera-Conferenz. Berl. klin. Wochenschr. 1885, No. 19, p. 309.

tizzano, ma dopo $^1/_2$-1 ora si rianno completamente. — Dopo 1-3 giorni muojono e si trova lo stomaco, il tenue ed il cieco ripieni di un liquido alcalino, incoloro e fioccoso, che è quasi una cultura netta dei vibrioni colerigeni.

Il *valore specifico* dei microbi scoperti dal Koch pare adunque provato, malgrado le molteplici obbiezioni mossegli da ogni parte, specialmente per opera di Lewis, di Finkler e Prior, di Klein e di Emmerich, alle quali tutte ha risposto il Koch (1) vittoriosamente. Lewis (2) ha voluto sostenere che il vibrione anzidescritto non è specifico del colera, perchè una forma identica si trova pure normalmente nella cavità boccale, specialmente nella patina dentaria. Anzitutto notiamo che questo reperto non è una novità, e che il Miller già nel 1879 avea descritto questa forma nell'interno dei denti cariati, ritenendola come causa della carie dentaria. Ma il Koch ha inoltre dimostrato che esistono fra le due forme differenze biologiche spiccatissime, e che « il microbo virgolato » del Levis nella gelatina neutra o debolmente alcalina non si sviluppa.

Ma l'obbiezione più forte è stata fatta da Finkler e Prior, i quali hanno detto di aver trovato lo stesso vibrione nelle deiezioni in 20 casi di *cholera nostras*. Il risultato della viva polemica che ha suscitato in Germania questo fatto, alla quale hanno preso parte tutti i più distinti batteriologi tedeschi, è stato che nelle culture, *cosidette pure*, di Finkler e Prior (3) sono stati isolati dal Koch e dal Van Ermengen 4 specie di microrganismi, 1 micrococco e 3 specie di bacilli, dei quali due diritti, i quali non fluidificano la gelatina, ed un altro ricurvo, simile a quello del colèra asiatico, sebbene un po' più grande e più grosso (Tav. II, fig. 6). Le differenze appaiono però più spiccate nelle culture in gelatina, giacchè quivi lo sviluppo di quest'ultimo bacillo è assai più rapido; sulle lastre di vetro le colonie appaiono di un colore giallo scuro (e non quasi incolore come quelle del vibrione del colèra), la gelatina viene fluidificata molto più rapidamente senza prendere la forma caratteristica ad imbuto, e dopo 24-36 ore emana un forte odore puzzolento.

Il D.re Emmerich (4) dice di aver trovato nel sangue e nell'interno degli organi dei colerosi un piccolo bacillo, che si troverebbe pure nell'intestino a lato del vibrione del Koch. Egli afferma inoltre di avere anche riprodotto la malattia caratteristica coll'innesto sottocutaneo delle cultnre nette di questi bacilli nelle cavie, cani, gatti e scimmie (5). Il Koch ri-

---

(1) Koch, Lavoro penultimo citato.
(2) Lewis, The Lancet. Sept. 20, 1884, p. 513.
(3) Finkler u. Prior, *Untersuch. über Cholera nostras*, Deutsche med. Wochenschr. 1884, No. 36.
(4) Emmerich, Berl. klin. Wochenschr. 1885, No. 2.
(5) *Vorträge in aerztl. Ver. zu München, über die Cholerafrage*, Berl. klin. Wochenschr. 1885, No. 15, p. 237.

tiene che questo reperto si debba ad impurità accidentali delle culture, avendo tutti gli altri osservatori ottenuto risultati negativi dalle ricerche fatte nel sangue e negli organi degli individui colpiti da colèra. A me sembra però più probabile che nei casi osservati dal D.re Emmerich si possa trattare piuttosto di un'infezione mista, come si osserva abbastanza spesso nelle malattie infettive.

Se però è così dimostrata l'importanza patogenica di questo vibrione, non mi pare si possa dire altrettanto del *valore diagnostico* dello stesso, come vorrebbe il Koch. È noto infatti che egli ha istituito nel suo laboratorio di Berlino un corso speciale di esercitazioni pratiche, cosidetto «Choleracursus», esclusivamente destinato a porre in grado i medici pratici di poter fare in modo sicuro la diagnosi di un primo caso di cholera, valendosi dei metodi di ricerca del Koch, per poter prendere a tempo le disposizioni igieniche opportune. È da notare bensì che nel periodo iniziale della cosidetta *diarrea premonitoria*, che è appunto quello in cui sarebbe più interessante, sotto ogni rapporto, di stabilire il diagnostico, non si è ancora dimostrata la presenza costante dei microparassiti; e le osservazioni fatte finora, anche nell'ulteriore decorso del male, dimostrano che la semplice osservazione microscopica per la diagnosi non basta, perchè lascia per lo più nell'incertezza, ed è necessario perciò ricorrere in ogni caso alle culture, fatte diluendo nella gelatina il materiale proveniente dall'intestino. Una tale operazione, per quanto non offra in sè alcuna difficoltà, richiede tuttavia una tecnica assai delicata ed un lungo esercizio, perchè riesca; ond'è che dubito che possa questo mezzo di diagnosi diventar generale, ed essere usato anche nelle campagne dai medici pratici.

Il processo consigliato dal Koch è lo stesso già descritto nel Cap. VI, e non istarò quindi a ripeterlo. Dirò soltanto che si deve anzitutto colle deiezioni alvine fare un gran numero di preparati microscopici e che, per materiale da diluirsi nella gelatina, deve scegliersi uno dei piccoli fiocchetti di muco biancastri, che si trovano sospesi nel liquido intestinale risiforme. Una volta sviluppate le colonie sulla gelatina, distesa sulla lastra di

vetro, se ne controlla la purezza col microscopio a debole ingrandimento, se ne fanno innesti nella gelatina contenuta nei tubi ed in quella distesa sui vetrini portoggetti, se ne osserva il movimento in una goccia di brodo, chiusa in un portoggetti incavato, e si coltivano sulle patate; se ne devono insomma osservare tutte le proprietà biologiche principali, che sono caratteristiche. Dopo 24 o 48 ore al più, si è in grado con tal metodo di stabilire il diagnostico sicuramente.

Schottelius (1) ha recentemente proposto per lo stesso scopo un altro processo, il quale non permette, come quello del Koch, di poter constatare tutte le proprietà caratteristiche del vibrione colerigeno, ma è però molto più semplice e più spiccio, giacchè rende possibile l'osservazione microscopica dopo 12 ore. Egli si vale della doppia proprietà di questo microbo, di essere mobile ed aerobio, per cui si raccoglie, sviluppandosi, alla superficie dei liquidi di nutrizione. Egli mescola perciò una grande quantità (100 a 200 ccm.) di deiezioni alvine sospette con 250-500 ccm. di brodo di carne leggermente alcalino, e lo mette in un vaso piuttosto alto e stretto, mantenendolo ad una temperatura fra 30-40° C. Si lascia fermo 12 ore ed allora, se si fanno preparati microscopici col liquido superficiale, preso dai margini, si trovano composti esclusivamente da microbi virgolati. Basta di averli visti una volta, per poter fare in tal guisa anche col semplice esame microscopico la diagnosi sicura del colèra.

Al difuori dell'organismo animale, questi microparassiti sono stati osservati dal Koch una volta soltanto in India nell'acqua di uno stagno, ove era stata lavata la biancheria di un primo individuo morto di colèra in una capanna vicina; quest'acqua divenne poi il punto di partenza di un'epidemia colerosa, che si diffuse tutto all'intorno. Nicati e Rietsch affermano di averli osservati più volte nelle acque provenienti dai luoghi infetti.

Si ritiene che l'infezione avvenga coll'introduzione degli alimenti, e che agisca come causa predisponente un disturbo gastrico qualsiasi, che distrugga l'acidità protettrice del succo gastrico. Si suppone pure che il virus agisca producendo sostanze velenose, che sarebbero riassorbite nell'intestino.

---

(1) Schottelius, *Zum mikrosk. Nachweiss, ecc.* Deutsche med. Wochenschr. 1885, No. 14.

Il Richard infatti, facendo ingerire ai porci un certa quantità di deiezioni alvine di colerosi, ne ha causato la morte, da 15 minuti a 2 $^1/_2$ ore dopo, coi sintomi di un avvelenamento anzichè con quelli di una vera malattia da infezione, come egli credeva.

Micrococco della risipola.

La contagiosità di questa malattia della pelle, che ha per lo più per punto di partenza una lesione di continuo, parlava già in favore della natura parassitaria della stessa; e molti osservatori, fra i quali Hueter, Recklinghausen, Billroth ed Ehrlich, Orth ed il Koch aveano anche trovato nei tratti di pelle ammalata ammassi di micrococci. Fehleisen (1) riuscì però per primo a coltivarli al difuori dell'organismo nella gelatina con infuso di carne e peptone, ed a riprodurre nell'uomo e negli animali (conigli) la stessa forma morbosa coll'innesto del prodotto delle culture isolate.

È un micrococco assai minuto (0,3-0,4 μ) e nella pelle malata si trova soltanto entro gli spazi e vasi *linfatici* (Tav. I, fig. 5), e non mai entro i vasi sanguigni, il che spiega il progredire del male sotto forma di striscie rosseggianti sulla superficie cutanea. Nella gelatina questi cocci crescono in forma di colonie bianche rotondeggianti, che non fluidificano la gelatina, ed osservati al microscopio appaiono riuniti a catena (streptococco). Muoiono facilmente in presenza dell'acido fenico in soluzione del 3 $^0/_0$ e nella soluzione di sublimato a 1 $^0/_{00}$ (Fehleisen).

Micrococco della polmonite.

Friedländer (2) e Frobenius hanno descritto per primi nell'essudato alveolare e nei linfatici dei polmoni colpiti da in-

---

(1) Fehleisen. *Die Aetiologie d. Erysipels.* Berlin 1883.

(2) Friedlaender, Virchow's Archiv. Bd. 87. — Fortschritte d. Med. 1883, No. 22 e 1884, No. 10.

fiammazione crupale, come anche nell'essudato pleurico e pericardico, una forma speciale di micrococci (Tav. II, fig. VIII e IX) rotondi od ovali, talora isolati, per lo più riuniti a due a due o a catena, coll'apparenza di bacilli.

La caratteristica principale morfologica di questi cocci è quella di essere circondati, in certe condizioni però e non sempre, da una *capsula* che è di forma rotonda, ovale o cilindrica, secondo che si tratta di mono-, diplo- o streptococci, e si colora debolmente colla genziana o colla fucsina in soluzione acquosa. Siccome è raro di trovare in altri microrganismi patogeni una capsula così evidente come in questi, così la stessa costituisce un distintivo morfologico importante. Sgraziatamente però non sempre i pneumococci ne sono provvisti, e nell'organismo umano ammalato si trovano rivestiti del loro involucro soltanto nel periodo ascendente del male; in generale dopo la 5ª o la 6ª giornata ne sono già privi. Negli animali invece, inoculati colle culture nette di questo parassita, si trovano negli organi e nel sangue i cocci specifici provvisti della loro capsula.

Al difuori dell'organismo animale, nelle culture in gelatina e sulle patate la capsula non esiste, ed in quelle sul siero di sangue si osserva talora, ma non costantemente; basta però, come ha mostrato Friedländer (1), porre una piccola quantità di queste culture nel brodo riscaldato a 35° C. circa, per vederle comparire dopo pochi minuti. Foà e Rattone (2) hanno inoltre osservato che, inoculando il prodotto delle stesse culture nelle cavie sottocute o nel peritoneo, due giorni dopo l'innesto si trovano già nei prodotti patologici i micrococci provvisti di capsula.

Le capsule si colorano facilmente, sia nei preparati di sezioni come in quelli essiccati sui vetrini: pei primi si è già detto che Friedländer consiglia la soluzione acida di genziana, per i

(1) Friedlaender, Fortschr. d. med. Bd. 3, 1885, p. 91.

(2) Foà e Rattone, *Osservazioni ed esperimenti sul pneumococco.* Comunicazioni fatte all'Accad. di med. di Torino il 12 nov. 1884 e il 16 gennaio 1885

secondi invece si usa il liquido di Ehrlich, lavando quindi i preparati rapidamente (1/2 minuto) nell'alcool; basta però anche la semplice soluzione acquosa di genziana all'1 %, riscaldata a 40° C., e la lavatura successiva colla sola acqua distillata, senza l'uso dell'alcool, per ottenere le capsule colorate debolmente e nell'interno di queste i cocci tinti di un colore più intenso.

Questo involucro sembra essere composto di mucina, o almeno di una sostanza che ha le stesse reazioni, giacchè è solubile nell'acqua e negli alcali diluiti ed insolubile invece negli acidi. — Sembra pure che la capsula esista soltanto quando i pneumococci trovansi all'apice del loro sviluppo, e che poi vada scomparendo a grado a grado, a misura che i microbi invecchiano.

Nell'organismo umano il parassita esiste abbondante, oltrechè nell'essudato che riempie gli alveoli polmonari, anche nei prodotti patologici della pleura e del pericardio infiammati, e nei vasi sanguigni della corteccia del rene infiammato egualmente (1). Nel sangue è stato trovato da Friedländer col mezzo delle culture in un solo caso dei sei, nei quali avea praticato le ricerche; probabilmente vi esiste soltanto in certi stadi della malattia, e non in tutti i casi. Negli animali, uccisi coll'innesto del pneumococco, si trovano invece abbondanti e muniti di capsula tanto nel sangue, come nell'essudato pleurico e pericardico. Le osservazioni di Friedländer, colle quali si accordano anche quelle fatte ultimamente da Foà e Rattone, hanno dimostrato che l'inoculazione diretta nel polmone dei cocci specifici in culture isolate riproduce la malattia caratteristica nei topi bianchi, nelle cavie e talora anche nei cani, e riesce invece sempre inattiva nei conigli. Salvioli e Zässlein (2) avrebbero invece riprodotto la malattia anche in questi ultimi animali. — Il pneu-

---

(1) Nauwerck, *Ueber morbus Brighthii bei croupöser Pneumonie*. Beiträge zur pathol. Anat. und Physiol. von Ziegler und Nauwerck. Jena, 1884.

(2) Salvioli, Archivio per le scienze mediche, vol. VIII, p. 127.

mococco, inoculato nel peritoneo delle cavie, vi produce un' infiammazione fibrinosa locale che si comunica anche alla pleura, e gli animali muoiono per setticemia, ma senza polmonite.

Al difuori dell' organismo animale è stata constatata dal D.re Emmerich (1) la presenza dei pneumococci nella polvere degli interstizi dell'impiantito nel dormitorio di una prigione, dove si era sviluppata un'epidemia di polmonite crupale. Il D.re Emmerich ha ottenuto da questa polvere il microbo specifico in cultura isolata, ed ha riprodotto la malattia nelle cavie e nei topi bianchi, anche col mezzo dell' inalazione di acqua finamente polverizzata, contenente i cocci in sospensione (2).

La coltivazione di questo parassita riesce facilmente nella gelatina, nel siero del sangue e sulle patate. Il modo di crescere nella gelatina è caratteristico, giacchè nel punto ove questa viene attraversata dall' ago di platino si sviluppa una colonia avente la forma di una *capocchia di chiodo*, o meglio di prominenza emisferica, di colore bianco-perlaceo; invece lungo tutto il canale scavato dall'ago stesso nell'interno della gelatina i cocci si sviluppano meno rapidamente, sotto forma di rivestimento biancastro. La gelatina non viene fluidificata, ma dopo 5-6 settimane assume all'intorno delle colonie una leggiera tinta brunastra. Sulle patate i pneumococci crescono rapidamente sotto forma di goccioline grigiastre, e dopo il 2° giorno si vedono comparire sulle colonie alcune bollicine dovute a sviluppo di gaz. Il Brieger ha pure osservato uno sviluppo di gaz, facendo sviluppare il pneumococco nella gelatina del Koch, a cui aveva aggiunto una soluzione di zucchero.

---

(1) EMMERICH, *Pneumoniecoccen in der Zwischendeckenfüllung*, ecc. Fortschr. d. Med. 1884, No. 5.

(2) Il D.re Pawlowsky (Berl. klin. Wochenschr., No. 22, 1885), crede di avere in una delle sue ricerche coltivato dall'aria il pneumococco; a me non sembra però che il microbo da lui coltivato sia identico con quello di Friedländer, mancando la caratteristica della capsula ed essendo riusciti positivi gli innesti fatti collo stesso nei conigli. Ad ogni modo sta il fatto, abbastanza interessante, che questo micrococco è patogeno per le cavie, conigli, cani e topi bianchi.

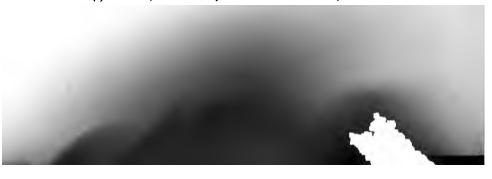
Riassumendo adunque, le caratteristiche principali morfologiche di questo parassita sono date *a*) dalla presenza della capsula in quelle certe condizioni, *b*) dalle figure di chiodo delle culture in gelatina, *c*) dallo sviluppo di gaz sulle patate. Queste però non servono a stabilire il diagnostico sicuro, se non quando vengono poi confermate dall'innesto, con risultato positivo, delle culture nette negli animali e dal riprodursi delle stesse caratteristiche nelle culture, fatte coi prodotti patologici degli animali inoculati. Difatti la forma di chiodo delle colonie nella gelatina è stata osservata dal D.re Passet (1) anche in un'altra varietà di micrococco, molto simile a quello pneumonico (pseudopneumococco), da lui osservato in due casi di ascesso.

Il valore diagnostico di questa forma negli sputi è assolutamente nullo, giacchè coll'osservazione microscopica si possono trovare cocci numerosi, con o senza capsula, anche nell'escreato di individui affetti da semplice bronchite o perfettamente sani; e neanche le culture possono dare risultati attendibili, esistendo negli sputi un numero grandissimo di altri microrganismi.

Notiamo finalmente che, se in tal guisa resta provato che in certi casi la polmonite crupale è prodotta dall'invasione del parassita ora descritto, non ne viene però di conseguenza che sia provata egualmente l'unità patologica di questa malattia; anzi in molti casi di polmonite genuina non è dato dimostrare la presenza dei cocci caratteristici, sicchè appare probabile che, come esistono varie specie di microrganismi piogeni, esistano pure diverse forme di infiammazione polmonare, dovute ad altrettante varietà di microrganismi.

Micrococco della gonorrea.

Fu primo il Neisser (2) che nel 1879 descrisse nel prodotto purulento dell'uretrite e congiuntivite blenorragica una

(1) Passet, Lavoro citato.
(2) Neisser, Centralblatt, f. d. med. Wiss. No. 28, 1879.

forma di cocci molto grossi (0,83 μ diam.), contenuti nelle cellule semoventi. Quest'osservazione fu in seguito confermata da molti altri, i quali trovarono costantemente nelle cellule del pus blenorragico la presenza dei cocci descritti dal Neisser (Tav. II, fig. 12).

Bokai (1) afferma di essere riuscito a riprodurre la malattia iniettando nell'uretra di 6 studenti, che si offrirono volonterosi, il prodotto delle culture del pus gonorroico; non ha detto però come ha fatto le culture, nè se queste erano nette oppure no, per cui le sue ricerche non hanno un valore assoluto.

Bockhart (2) invece ha inoculato nell'uretra di un individuo, affetto da demenza paralitica all'ultimo stadio, il gonococco coltivato in gelatina fino alla 4ª generazione, ed ha ottenuto un'infiammazione violenta, che dall'uretra si propagò su su fino ai reni, con formazione quivi di ascessi: egli ha trovato numerosi i cocci specifici nelle cellule bianche che riempivano i vasi linfatici e sanguigni e gli spazi connettivi della mucosa, della sottomucosa e del tessuto connettivo dei corpi cavernosi, specialmente in corrispondenza della fossetta navicolare. Il Bockhart ritiene di avere riprodotto in questo caso il quadro morboso della gonorrea, il che a me non pare; giacchè fortunatamente la malattia non è mai così grave, com'è descritta nel caso precedente. È assai dubbiò perciò che si trattasse di una cultura veramente isolata e netta di gonococci, e non inquinata piuttosto da qualcuna delle forme piogene, tanto più che anche il reperto di costui a riguardo della posizione degli elementi specifici nelle cellule epiteliali, e dentro le stesse cellule bianche, non concorda con quello della maggior parte degli altri osservatori.

Il Bockhart infatti sostiene di avere osservato i gonococci liberi nel liquido, o solamente aderenti alle cellule bianche del pus, e di non averli mai osservati nell'interno delle cellule epi-

---

(1) Bokai u. Finkelstein, Prag. med.-chir. Presse. 1880 Mai.

(2) Bockhart, *Beitrag zur Aetiologie und Pathologie des Harnröhrentrippes*, Sitzungs-Berichte d. Phys.-med. Gesellschaft zu Vürzburg, 1883 No. 1.

teliali. Invece Haab (1), Leistikow (2), Eschbaum (3), Welander (4), i quali hanno osservato un numero grandissimo di casi di gonorrea, concordano tutti nello ammettere che una delle principali caratteristiche dei microbi in discorso è appunto quella, che si trovano sempre *contenuti entro le cellule bianche del pus* ed anche entro le cellule dell'epitelio uretrale. Quest'ultimo punto della questione è interessante, perchè giustifica l'applicazione della cura abortiva colla soluzione diluita di sublimato o di altri disinfettanti nei primi 2 o 3 giorni della malattia. Se nei preparati fatti sui coproggetti si trovano talora i gonococci liberi, ciò dipende dal rompersi delle cellule sovracariche di microparassiti.

I gonococci sono isolati o per lo più riuniti a due a due, ed anche a gruppi di 4 o di 8, non mai a catena. Si colorano bene colla fucsina e colla genziana, ma specialmente col bleu di metilene.

Dalle ricerche fatte da Oppenheimer (5) sull'azione degli agenti chimici sullo sviluppo dei gonococci risulta, che le sostanze che meglio delle altre servono per arrestarlo sono: il sublimato (1 : 20,000), il nitrato d'argento (2 : 100), il solfato e il nitrato di mercurio (1 : 10,000), il creosoto (1 : 20) e l'acido fenico (1 : 500); riescono invece inattivi il magistero di bismuto, l'acetato di piombo, l'allume, il solfato di zinco, il cloruro di zinco, il clorato ed il permanganato di potassa, la resorcina, il tannino e l'acido salicilico. Il copaive ed il cubebe si mostrarono di per

---

(1) Haab, *Blenorrhöa gonorrh. neonat.* Corresp.-Bl. f. Schweizer Aerzte, 1881.

(2) Leistikow, *Ueber Bacterien bei den venerischen Krankheiten.* Charité-Annalen 1882.

(3) Eschbaum, *Ein Beitrag z. Aetiologie d. gonorrh. Secrete.* Deutsche med. Woch. 1883, No. 13.

(4) Welander, *Ueber die pathog. Mikroorgan. des Trippers.* Ref. in Schmidt's Jahrbücher. Bd. 200, 1883.

(5) Oppenheimer, *Untersuch. ü. d. Gonokokkus* (Neisser) Arch. f. Ginaekologie XXV, I.

sè egualmente innocenti; ma l'orina, in seguito all'ingestione di quelli, conteneva un materiale antisettico.

Il loro trovarsi costante nel prodotto patologico di tutte le forme di malattia gonorroica, e la loro posizione caratteristica li fa ritenere giustamente dai più come causa della gonorrea. Manca però ancora, a mio avviso, di farne le culture sicuramente isolate, di descriverne le proprietà di sviluppo caratteristiche sui mezzi di nutrizione solidi e trasparenti, e di fare infine con queste gli innesti nell'uomo, giacchè gli altri animali sembrano essere refrattari a siffatta malattia.

Micrococci piogeni.

Le ricerche moderne fatte sui microrganismi contenuti nel pus, proveniente dalle malattie più svariate, hanno avuto per risultato importantissimo di stabilire in maniera positiva l'unità patogenetica di un gran numero di forme morbose, apparentemente assai disparate. La setticemia e l'endocardite ulcerosa, la piemia e la febbre puerperale, gli ascessi acuti, di qualunque natura e di qualsiasi località, e l'osteomielite riconoscono tutte la loro causa in forme speciali di cocci, che si designano appunto col nome di *piogeni*.

Accenniamo qui soltanto di volo al significato che oggidì si deve attribuire alle espressioni di « setticemia » e di « piemia ». Ambedue stanno a significare un'alterazione profonda della crasi sanguigna, una vera *discrasia*, derivante da una causa comune: nella prima però si ha l'alterazione del sangue generale, senza alcuna localizzazione; nella seconda invece si hanno per di più processi di infiammazione, localizzati a varie parti del corpo (ascessi piemici). Della setticemia si distinguono due forme: una è l'*intossicazione settica* del sangue, semplice, senza che in questo esistano microrganismi; e l'altra, la *setticemia propriamente detta* o *setticomicosi*, è contradistinta dallo sviluppo di microbi nel sangue circolante. Queste varie forme, di intossicazione settica, di setticomicosi e di piemia, possono trovarsi isolate, ma spesso si combinano formando un quadro morboso complesso di manifestazioni patologiche svariate.

Il manifestarsi della setticomicosi ora semplice, ed ora invece complicata con ascessi piemici, da taluni si attribuisce a proprietà specifiche

dei singoli microrganismi patogeni e da altri invece, forse a maggior ragione, alla diversa porta d'ingresso del virus infettante.

Fu il primo Davaine (1) che designò col nome di setticemia una malattia da infezione micotica, prodotta nei conigli coll'innesto sottocutaneo di sangue putrefatto.

Il Koch ha descritto col nome di *Mäusesepticämie*, una malattia prodotta nei topi bianchi dal piccolo bacillo già descritto. Un' altra forma di setticemia si sviluppa pure nei conigli coll'iniezione di saliva, come hanno provato le ricerche di Raynaud e Lannelongue (2), quelle di Vulpian (3), di Kühn (4) e di Ziegler e Touton. La forma di questo batterio setticemico è stata pure testè isolata dallo scrivente, in collaborazione col D.re De Mattei, e studiata nelle sue proprietà biologiche principali.

Vi sono alcune forme di setticemia prodotte da cocci ed altre da bacilli, e si possono distinguere perciò un gran numero di varietà di questa malattia.

Lo studio dei microparassiti di quelle malattie da infezione che i tedeschi designano col nome di « Wundinfectionskrankheiten » (malattie infettive da ferita) è stato fatto nell'uomo, dopo il celebre lavoro del Koch, specialmente per opera di Ogston (5), Becker (6), Rosenbach (7), Krause (8) e recentemente dal Dre. Passet (9), i quali hanno studiato le forme di microbi che si rinvengono nel pus proveniente da ascessi acuti, di qualunque natura e derivazione.

L'Ogston ha posto in sodo il duplice fatto, confermato in seguito da tutti gli altri osservatori, che la formazione degli

---

(1) Davaine, Bull. de l'Acad. de méd. 17 sept. 1862.

(2) Raynaud et Lannelongue, Bull. de l'Acad. de méd. 8 Février, 1881.

(3) Vulpian, Ibid. 22 Mars 1881.

(4) Kühn, Berl. klin. Wochen. 1881.

(5) Ogston, *Micrococcus poisoning*, Journ. of. anat. and phys. 1882. Vol. 17.

(6) Becker, *Vorläufige Mittheil. über den die acute infectiöse Osteomyelitis erzeugenden Mikroorganismus*, Deutsche med. Wochenschr. Nov. 1883.

(7) Rosenbach, *Mikroorg. bei d. Wundinfectionskrankh. d. Menschen*, Wiesbaden 1884.

(8) Krause, *Ueber einen bei der ac. infect. Osteomyel. ecc.* Fortschr. d. Med. 1884, No. 7 e 8.

(9) Passet, *Ueber Mikroorg. d. eitrigen ecc.* Fortschr. d. Med. 1885, No. 2 e 3.

ascessi acuti è sempre dovuta alla presenza di micrococci, e che non v'ha una sola specie, ma molte forme di microrganismi che hanno la proprietà di essere piogeni. L'Ogston ha trovato nel pus 2 specie di microrganismi, una di cocci a catena, che colla nomenclatura del Billroth ha chiamato *streptococcus*, e l'altra di cocci riuniti in zooglea a forma di grappolo, da lui designati perciò col nome di *staphilococcus*. Il Rosenbach ne ha coltivate 4 specie: *a*) *staphiloccus piogenes aureus* ed *albus*; *b*) *micrococcus piogenes tenuis*; *c*) *streptococcus piogenes*. Il D.re Passet ne ha coltivato 7 specie: *a*) *Staphilococcus albus, aureus, citreus, cereus albus* e *cereus flavus*; *b*) *streptococcus*; *c*) *Pseudopneumococcus*.

Le varie denominazioni date a queste varie specie si riferiscono specialmente alle caratteristiche di sviluppo degli stessi sulla gelatina e sull'agar-agar. L'azione però fisio-patogenica è di tutti la stessa: è vero che nella maggioranza dei casi la formazione degli ascessi acuti è dovuta alla presenza dello stafilococco, ma vi si trova però talora unito anche lo streptococco, ed ambedue le specie possono esercitare sul nostro organismo un'influenza di varia intensità; così lo stafilococco piogeno può essere la causa d'un semplice panareccio od orzaiolo, come di un flemmone diffuso pericoloso o di un'osteomielite mortale.

A proposito di quest'ultima malattia, giova ricordare che Becker nel 1883 annunciò la scoperta del micrococco specifico della stessa; ma Rosenbach e Krause hanno in seguito dimostrato che nel pus da osteomielite, accanto al micrococco giallo (staphil. piog. aureus) trovato da Becker, si trova pure uno stafilococco bianco e talora anche lo streptococco, e che gli stessi microbi si trovano nel pus di qualunque ascesso acuto. Socin e Garri (1) hanno confermato le osservazioni di Rosenbach, ed hanno inoltre trovato che questi cocci si trovano

(1) Socin e Garri, Congresso di chirurgia tenuto a Parigi dal 6 al 12 aprile 1885.

anche nel sangue degli individui affetti da osteomielite. Il Garri ha anzi inoculato sottocute su se stesso lo stafilicocco coltivato dal pus di osteomielite, e ne ha ottenuto un flemmone diffuso, ma non quest'ultima malattia.

Il reperto costante di questi microparassiti nell'osteomielite fa ritenere giustamente che la loro presenza non sia accidentale, ma sia legata piuttosto in istretto rapporto colla genesi della stessa, per quanto esista ancora a questo riguardo un qualche punto oscuro. Difatti le culture nette di tali microbi, inoculate negli animali, non vi riproducono la malattia se non quando si produca in questi in pari tempo una frattura ossea artificiale, mentre nella maggior parte dei casi di osteomielite nell'uomo questo non accade.

Le stesse specie di cocci, colle stesse caratteristiche di sviluppo sulla gelatina che adesso esporremo, sono state pure osservate dal D.re Escherich (1) nel latte di donne affette da febbre puerperale.

A) Lo Stafilococco piogeno (*bianco, aureo* e *citrino*) si trova nel pus per lo più riunito a diplococco, oppure isolato, in mezzo ai corpuscoli purulenti e talora anche nel protoplasma degli stessi: nelle culture o nei preparati di sezioni si vede sotto forma di zooglea. I cocci sono rotondeggianti, poco regolari e di varia grandezza (0,87 μ di diametro medio). Nella gelatina lo sviluppo di queste tre varietà di cocci piogeni comincia al 2-3° giorno alla temperatura dell'ambiente, sotto forma di colonie bianco-grigiastre (stafil. bianco) o giallastre (aureo e citrino), attorno alle quali la gelatina è già liquefatta. Questa col fluidificarsi si intorbida, ma poi ritorna ad essere chiara, assumendo un odore acido caratteristico. In fondo si raccolgono i cocci sotto forma di sedimento biancastro, o arancio scuro, o giallo limone, secondo la varietà degli stessi.

---

(1) Escherich, *Bacter. Untersuch.*
No. 8, 1885.

Per ottenerli separati nelle culture sulle lastre di vetro si adopera l'agar-agar, la quale non viene fluidificata come la gelatina e permette di osservare anche col microscopio le caratteristiche di sviluppo. Il colorito delle colonie, che distingue appunto le varietà in discorso, si fa sempre più spiccato coll'invecchiare delle culture e sta sotto l'influenza diretta dell'aria.

Tutti e tre gli stafilococci hanno le stesse proprietà patogeniche. Iniettati nella cavità pleurica o addominale dei conigli, cavie e topi bianchi, gli animali muoiono dopo 1-2 giorni con una forma setticemica, trovandosi emorragie diffuse dei polmoni, congestione dei visceri addominali e pleurite o peritonite incipiente, mentre nel sangue e nel succo dei tessuti si trovano abbondanti i cocci specifici. Lo stesso risultato si ottiene coll'iniezione intravenosa nei conigli e nelle cavie. In questo ultimo caso, se l'animale resta in vita più di due giorni, si osservano nei reni alterazioni caratteristiche, prodotte da embolie microbiche dei canalicoli retti, le quali comprimendo i vasi dànno luogo ad infarti emorragici. Se nei conigli, a cui si sono iniettati nel sangue gli stafilococci, si produce una frattura ossea ed una contusione muscolare, si ha produzione di pus nella località maltrattata. Inoculati sotto la cute degli stessi animali, dopo qualche giorno si produce un ascesso; iniettati nelle articolazioni dei conigli vi producono egualmente un'infiammazione purulenta.

B) Streptococco piogeno. Si trova nel pus degli ascessi, in catene di 3-30 e più individui riuniti insieme, in modo però da avere l'aspetto di catene formate da diplococci. Il loro diametro oscilla fra 0,58-0,73 μ. Tanto l'aspetto microscopico, come quello delle colonie sulla gelatina è uguale perfettamente a quello dello streptococco coltivato da Fehleisen dalla cute eresipelatosa. Sulla gelatina si sviluppa alla temperatura ordinaria sotto forma di piccoli ammassi bianco-grigiastri, rotondeggianti, del diametro di circa 2 μ, sparsi lungo tutto il percorso dell'ago di platino, non fluidificanti la gelatina. Sul siero di sangue tanto gli streptococci della risipola come quelli del pus si sviluppano sotto forma di strie, nastriformi e sottili: sulle patate invece non si vede traccia

alcuna di sviluppo. Nell'agar-agar le due specie anzidette si sviluppano pure cogli stessi caratteri di colonie irregolari e non puntiformi come nella gelatina. Riguardo all'azione patogenica dello streptococco piogeno, le osservazioni fatte finora sono discordi. Krause, Ogston e Rosenbach hanno trovato che è patogeno pei conigli e pei topi bianchi. Il D.re Passet invece dice di avere avuto coll' innesto delle culture isolate di questo micrococco risultati sempre negativi, tanto sui topi, come sulle cavie e sui conigli, concordando così anche in ciò coll'azione fisio-patogenica di quello della risipola. Probabilmente adunque anche la risipola entrerà in seguito a far parte dell'unità patologica delle malattie suaccennate.

C) Pseudopneumococco. Merita di esser menzionato a se, specialmente perchè per alcune sue caratteristiche di sviluppo s'avvicina assai al pneumococco di Friedländer e Frobenius, dal quale è necessario di saperlo distinguere. Innestato difatti sulla gelatina, la colonia che si sviluppa alla superficie nel punto dell'innesto diventa prominente, fino ad assumere la forma emisferica, simile a quella del cocco pneumonico; se ne distingue però pel fatto che il primo è un puro aerobio, e non si sviluppa lungo il tragitto dell'ago di platino. Nelle colonie vecchie in ambedue i casi la gelatina assume una tinta brunastra. Osservando al microscopio i preparati fatti col pseudopneumococco, si vedono prevalenti le forme rotonde ed isolate su quelle lunghe, simili a bacilli, le quali prevalgono invece nel vero pneumococco. La differenza più spiccata si ha però dalle culture sulle patate, giacchè in quelle del microbo della polmonite, mantenute a 37° C., si ha distinto al 2° giorno lo sviluppo di bollicine di gaz, che manca sempre in quelle del cocco piogeno. In condizioni favorevoli anche quest'ultimo appare circondato da una capsula, non però così evidente come quella dei pneumococci.

Quanto alle proprietà patogeniche il falso pneumococco, inoculato nella pleura tanto dei topi e delle cavie, quanto dei conigli, vi produce, secondo Passet, un' infiammazione della pleura con diffusione più o meno estesa del processo ai polmoni; mentre

invece i conigli, secondo la maggior parte degli osservatori, si mostrano refrattari all'azione del cocco pneumonico. Ambedue le specie però, iniettate nella giugulare dei conigli, producono in questi una forma di setticemia. Notiamo finalmente che l'innesto sottocutaneo del micrococco pneumonico nelle tre specie di animali anzidetti è innocente, mentre quello del pseudopneumococco, secondo le esperienze di Passet, produce ascessi nelle cavie e nei conigli, e nei topi bianchi la setticemia: e così parimenti l'inalazione dell'acqua contenente i pneumococci riproduce nei topi bianchi la polmonite, mentre i microbi del pus, fatti inalare nelle stesse condizioni, riescono sempre inattivi.

Il D.re Passet ha inoltre osservato nel contenuto purulento di un ascesso perianale un'altra forma di microbo, un bacillo lungo 1,45 μ circa e largo 0,58 μ (Tav. 1ª fig. 6), il quale si sviluppa sulla gelatina, specialmente alla superficie, sul siero del sangue e sulle patate, sviluppando su tutti questi mezzi un odore sgradevole, simile a quello del pus dal quale fu coltivato. È stato chiamato perciò *bacillus piogenes foetidus*. È patogeno pei topi bianchi e per le cavie, non lo è per i conigli.

Tralasciamo di parlare del *micrococco della piemia dei conigli* e di quello della *setticemia* degli stessi animali, nonchè del *micrococco della gangrena progressiva* dei topi e di quello dell'*ascesso progressivo* dei conigli, osservati e studiati tutti dal Koch: questi hanno difatti principalmente un interesse storico, costituendo appunto il primo contributo sperimentale, positivo, portato alla teoria parassitaria delle malattie da infezione. Non parlo neanche di quella forma di cocco (Nosema bombycis), scoperto da Cornalia (1) quale causa della cosidetta « pebrina » o « malattia dei corpuscoli » dei bachi da seta, e neppure del

(1) Cornalia, Rapporto della Commissione per lo studio della malattia dei bachi, ecc. Milano, 1857.

micrococcus bombycis, trovato dal Pasteur, e che è causa di un'altra malattia del baco cosidetta « flaccidezza », giacchè non hanno per la medicina un'importanza diretta.

Accenniamo in fine che forme di cocci sono state osservate in un gran numero di altre malattie infettive, tanto degli animali che dell'uomo. Così ho già detto che si trovano abbondanti nelle valvole del cuore, colpite da endocardite ulcerosa; sono stati osservati nella sifilide (Klebs, Aufrecht), nell'atrofia gialla acuta del fegato (Eppinger), nell' « Haemophilia neonatorum » (Klebs), nella scarlattina (Coze e Feltz), nella malaria (Sehlen), nella difterite (Carter, Klebs, Heubner, Löffler), nel vaccino e nel vaiuolo (Weigert, Klebs, Hallier, Tappa, Plaut), senza però che sia stato dimostrato finora un nesso eziologico sicuro fra la presenza dei microbi e le varie malattie summentovate.

Tutti i microparassiti di cui si è parlato finora appartengono agli « Spaltpilze » di Nägeli o « batteri » di Cohn e di Koch. Ma si osservano parassiti appartenenti ad altri ordini della stessa classe di microrganismi, e specialmente a quella degli *Ifomiceti* o *Conidiomiceti* (« Schimmelpilze » di Nägeli); fra questi dobbiamo annoverare princicipalmente l'*Actinomyces*, il *Chionyphe Carteri* ed i tre funghi che producono le malattie cutanee della *tigna favosa*, della *tigna tonsurante* e dalla *pitiriasi*.

Actinomyces.

Questo fitoparassita è stato descritto la prima volta nei bovini da Rivolta (1) e da Perroncito (2) nel 1875, nei tumori sar-

---

(1) Rivolta, Giornale di anatomia e di fisiologia degli animali. Pisa 1875.
(2) Perroncito, *Osteosarcoma della mascella anteriore e posteriore dei bovini.* Articolo dell'Enciclopedia agraria italiana 1875.

comatosi della mandibola di questi animali. In seguito il Bollinger (1) ha studiato più esattamente una tal forma di malattia, classificandola fra quelle parassitarie colla denominazione di « Actinomycosis », essendo stato il microfita caratteristico classificato da Harz fra i funghi, col nome di *Actinomyces bovis*. Simili osservazioni sui bovini si estesero in breve, e si trovò il parassita non solo nei sarcomi mandibolari, ma anche nei tumori congeneri di altre regioni svariate del corpo di questi ed anche di altri animali, come nel porco (Johne) e nel cane (Vacchetta).

Nella specie umana sembra che sia stato veduto la prima volta da Lebert nel 1857, senza però che ne riconoscesse la natura: i primi casi positivamente riconosciuti della malattia vennero osservati da Israel (2) e da Ponfick (3) in Germania, e da Perroncito e Reymond in Italia.

La malattia prodotta dalla presenza dell'*Actinomyces* è alquanto diversa negli animali e nell'uomo: nei bovini si ha nel mascellare inferiore, dove più di frequenti si manifesta il male, una vera neoformazione d'aspetto sarcomatoso, che ha origine dagli alveoli o dalla parte spongiosa dell'osso, si ingrossa a poco a poco, usurando l'osso stesso, e si apre nella cavità orale e al difuori per mezzo di tragitti fistolosi. Facendo un taglio del tumore si vede sulla superficie di sezione un gran numero di focolai gialli, ascessiformi, dai quali col raschiamento si esporta una massa densa, di aspetto purulento, nella quale si notano un'infinità di piccoli granuli, bianco-giallastri o giallo-solfo, grossi all'incirca come un capo di spillo, i quali non sono altro che un aggregato di globetti di *Actinomyces*.

Ognuno di questi piccoli globetti ha la forma di una mora e, schiacciato fra due vetrini, mostra la parte interna costituita

---

(1) Bollinger, *Ueber eine neue Pilzkrankheit beim Rinde*. Centr.-Bl. f. d. med. Wissensch. 1877, No. 27.

(2) Israel, *Neue Beobachtungen auf dem Gebiete der Mycosen des Menschen*. Virchow's Archiv. Bd. 74, p. 15.

(3) Ponfick, *Ueber eine wahrscheinlich mykotische Form von Wirbelcaries*. Berl. klin. Vochenschr. No. 23, 1879.

dai filamenti del fungo, sottilissimi ed intrecciati (*ifi*, il cui insieme costituisce il *micelio*), i quali si dirigono verso la periferia e terminano nei *conidi*, rigonfiati a mo' di pera o di clava, giallognoli e fortemente rifrangenti la luce. Siccome queste masse, specialmente nei bovini, sono spesso calcificate, così per istudiarne la struttura occorre talora trattarli coll'acido cloridrico diluito. Nelle sezioni di pezzi del tumore, induriti nel liquido di Müller e nell'alcool, questi ammassi del fungo appaiono anche senza essere coloriti, come si vedono disegnati nella Fig. 8, Tav. 1ª. — Gli stessi ammassi del parassita si trovano poi diffusi nelle ghiandole linfatiche finitime, nella laringe e nella faringe. Si è osservato pure nel bove lo sviluppo primitivo del parassita in altre località, ad es., nei polmoni.

Nell'uomo il quadro morboso cambia alquanto. Si ha nel punto d'ingresso del parassita una tumefazione, ma questa non raggiunge mai il volume che ha nei bovini e si estende piuttosto in superficie ed in profondità, coi caratteri di un'infiammazione cronica suppurativa. L'infiltrazione è costituita da tessuto di granulazione, di aspetto lardaceo; vi si produce pus che si fa strada attraverso tragitti fistolosi, i quali contengono appunto il liquido puriforme con quei corpicciuoli giallo-solfo, che permettono di fare la diagnosi della malattia. Quando questa ha origine dalle ossa mascellari, come è il caso più frequente, l'infiltrazione purulenta si può estendere lungo i vasi del collo, raccogliersi attorno alle costole o in vicinanza dei corpi vertebrali, che ne sono usurati, e quivi formare nuovi ascessi e tragitti fistolosi, che si aprono all'esterno. Le nodosità formate dallo sviluppo del fungo possono, come talora si è osservato, usurare le pareti di grossi vasi venosi (della giugulare, ad es.), ed aversi così la diffusione *metastatica* della malattia. All'infuori di questo caso però la malattia è soltanto locale e si diffonde lentamente per contiguità di tessuti.

Non si deve credere che la malattia sia sempre localizzata alla mandibola o alla colonna vertebrale; il parassita può svilupparsi primitivamente in qualsiasi parte del corpo, secondo la

porta d'ingresso. Così si sono descritti casi di *peritonite lenta attinomicotica,* in cui il parassita era penetrato per la via del canale intestinale o per quella dell'apparecchio genitale (Zemann (1)); casi di attinomicosi limitata del colon (Chiari (2)) e di penetrazione del parassita da una ferita del pollice. In un caso osservato da Canali (3) si ebbe lo sviluppo primitivo del parassita nell' albero bronchiale, risultandone una specie di bronchite putrida: in un altro descritto da Maiocchi l'Actinomyces si era sviluppato nella pelle.

Negli animali probabilmente l'Actinomyces penetra nella bocca cogli alimenti, dove si fa strada nei tessuti per mezzo di piccole lesioni di continuo, prodotte da quelli nella mucosa orale. Il D.re Iensen ha infatti osservato nel bestiame che si nutriva dell'erba cresciuta in un terreno vicino al mare delle coste danesi, soggetto spesso ad inondazioni, un'epidemia di attinomicosi, la quale cessò non appena si escluse dall'alimentazione l'erba di quella località (4).

La ricerca di questo parassita ha una grande importanza tanto nei casi di malattia dell'uomo, perchè facendo la diagnosi in principio si può coll'intervento chirurgico salvare il paziente, come anche nell'esame delle carni degli animali domestici destinati all'alimentazione, specialmente del maiale, nel quale la malattia pare s' incontri più di frequente di quanto prima si credeva. Lo Johne mette in dubbio che nei casi osservati da Duncker (5) si tratti della stessa forma di Actinomyces osser-

---

(1) Zemann, *Ueber die Actinomycose des Bauchfells und der Baucheingeweide beim Menschen.* Wien. med. Jahrb. 1883, p. 477.

(2) Chiari, *Ueber primäre Darmactinomycose des Menschen.* Prag. med. Woch. 1884, No. 16.

(3) Canali, *La bronco-attinomicosi nell'uomo.* Riv. clinica di Bologna 1882, p. 588. Con una nota di Majocchi sopra un caso di attinomicosi della pelle.

(4) Bang, *Die Strahlenpilzerkrankung.* Deutsch. Zeitschr. f. Thierm. u. vergleich. Pathologie, X, p. 249.

(5) Duncker, *Strahlenpilze im Schweinefleisch,* Zeitschr. f. Mikrosk. u. Fleischbeschau, III, 1884, No. 3.

vata nell'uomo; ma ad ogni modo le osservazioni di Israel (1), controllate anche dal Virchow, e quelle dello stesso Johne e di altri sul proposito pongono fuori dubbio la presenza di di questo parassita anche nelle carni del maiale. Israel dice che, contrariamente a quanto si era ammesso finora, le clave del fungo si alterano facilmente in presenza dei reattivi e talora anche coll'acqua semplice: consiglia perciò di fare le ricerche del pus o della carne di maiale (schiacciata fra due vetrini) senza aggiunta di alcun liquido. Per conservare i pezzi patologici relativi consiglia l'acido osmico (1 %), o la soluzione di Müller e l' alcool. Non v'è bisogno di colorazione per dimostrarne la presenza.

Quanto alla trasmissibilità della malattia, è stata dimostrata negli animali anzitutto da Johne (2), il quale ha inoculato con successo sotto la cute dei bovini i granuli del fungo sospesi nell'acqua. In seguito il Ponfick (3) ha ottenuto lo stesso risultato, innestando nel cavo peritoneale dei buoi pezzi di tumore specifico; ed Israel (4) ha sperimentalmente dimostrato l'identità della malattia negli animali e nell'uomo, ottenendo la riproduzione dei nodi caratteristici nell'addome di un coniglio, in cui avea introdotto un pezzo di tessuto di granulazione di un ascesso peripleuritico d'origine micotica.

Le proprietà biologiche di questo microparassita sono finora poco conosciute, essendo assai difficile coltivarlo come saprofita nei mezzi di nutrizione artificiali. Israel (5) dice di essere riuscito a coltivarlo sul siero del sangue solidificato, ma la descri-

---

(1) Israel, *Demonstration von Actinomyces im Schweinefleisch*, Berl. klin. Wochenschr. 1884.

(2) Johne, *Die Actinomycose ist eine durch Impfung übertragbare Infectionskrankheit.* Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1880, No. 48.

(3) Ponfick, *Die Actinomycose des Menschen.* Berlin 1882.

(4) Israel, *Erfolgreich. Uebertrag. der Actinomycose des Menschen auf Kaninchen.* Centralbl. f. d. med. Wiss. 1883, No. 27.

(5) Israel, *Ueber die Cultivirbarkeit des Actinomyces.* Virch. Arch. Bd. 95, 1884.

zione che ne fa è così incompleta, che è impossibile ritrarne l'imagine del suo sviluppo. Non è ancora stabilito con certezza a quale categoria di funghi appartenga.

CHIONYPHE CARTERI. Questo fungo, appartenente pure agli ifomiceti, è stato osservato da Carter in una malattia dei piedi che si osserva nelle Indie, cosidetta *Madura-foot* (piede di Madura). Il micelio del fungo penetrerebbe nel derma e nel tessuto sottocutaneo del piede, producendovi un'infiammazione purulenta con neoformazione di tessuto, simile a quanto si osserva nell'attinomicosi. Recentemente però si è posto in dubbio il nesso causale fra questo fungo e la malattia in discorso (1).

Alcuni ifomiceti si riscontrano poi come parassiti della pelle, nella quale producono forme morbose caratteristiche, conosciute sotto il nome di *Tigna favosa, Erpete circinnato o tonsurante, Sicosi o mentagra, Kerion, Onicomicosi, Eczema marginato, Pityriasis versicolor*. In tutte queste malattie si ha negli strati epidermoidali della cute e nei peli (dove esistono) uno sviluppo di filamenti e di conidi, i quali disgregano le cellule e penetrano nell'interno del pelo, irritando la cute e dando luogo alla formazione di croste e di squame, più o meno abbondanti. In certi casi si è osservato anche nella mucosa dell'apparato digerente lo sviluppo del fungo della tigna favosa (Kundrat (2)). Secondo Grawitz i miceli e i conidi dei funghi, che si osservano nelle diverse affezioni della cute suaccennate, apparterrebbero tutte ad un'unica specie, all'« Oidium lactis » e le differenze, le quali del resto

---

(1) Vedi al proposito:
CARTER, *On mycetoma or the fungus disease of India*. London 1874.
LEWIS e CUNNINGHAM, 9 Rep. of the Sanit. Commissioner of India.
CORRE, *La maladie de Ballingal ou piéd de Madura*. Paris 1883.
(2) KUNDRAT, *Ueber Gastroenteritis favosa*. Ref. in Fortschr. d. Med. No. 1, 1885.

non sono molto spiccate, che si notano in quelli nelle diverse affezioni della cute, sarebbero dovute a nient'altro che alla differenza del substrato nutritivo. Si ritiene però generalmente che appartengano a specie diverse, e che la tigna favosa sia prodotta dall'ACHORION SCHOENLEINII (Tav. I, fig. 2 e 2 bis), l'erpete circinnato, la sicosi, il kerion e certi casi di eczema marginato sieno causati dal TRICOPHYTON TONSURANS (Tav. I, fig. 3 e 3 bis) e la pityriasis versicolor dal MICROSPORON FURFUR (Tav. I, fig. 1).

Del modo di colorire questi vari microparassiti nelle squame epidermiche e nei peli si è già parlato. Quanto alle proprietà biologiche degli stessi non sono ancora bene conosciute, non essendosene finora, per quanto mi è noto, fatte le culture sui mezzi di nutrizione solidi del Koch. Soltanto pel *Tricophyton*, Morris Malcom e Henderson (1), sono riusciti a coltivarlo nella gelatina e ad osservare così lo sviluppo dei filamenti dalle spore, riproducendo eziandio la malattia nell'uomo coll'innesto cutaneo del prodotto delle culture.

Si riscontra anche non di rado la presenza di altri ifomiceti, quale epifenomeno di malattie dei vari organi che sono in commercio più o meno diretto col mondo esterno (stomaco, polmoni, bronchi, trachea, cornea, condotto auditivo esterno, cavità boccale e nasale). Si trovano quindi filamenti e conidi nella patina che ricopre la lingua e i denti dei malati, nelle bronchiettasie, nelle caverne polmonari, e specialmente nella gangrena polmonare, accanto ad altre forme di microrganismi. Questi però anzichè parassiti, devono essere considerati come semplici *saprofiti*, giacchè si sviluppano in parti già morte.

L'aspergillo che si trova nei polmoni è, secondo Lichtheim (2), l'*Aspergillus fumigatus*. Nel condotto auditivo esterno e nell'orecchio medio Bezold ha trovato l'*Aspergillus fumigatus*, l'A. *niger* ed il *flavus*.

Alcune forme però, e specialmente gli Aspergilli, sono anche realmente patogene, per gli animali in particolar modo. In questi infatti si conoscono parecchie malattie prodotte dagli ifomiceti (per es. il « Moscardino » o « calcino » del baco da seta, prodotta dalla *Botrytis Bassiana*, che è il primo parassita vegetale che sia stato scoperto e di cui la gloria spetta all' italiano

(1) MORRIS, MALCOM and HENDERSON, *The cultivation and life history of the ringworm fungus*. Journ. R. microsc. Soc. Ser. II, vol. 3, 1883.
(2) LICHTHEIM, Berl. klin. Vochenschr. 1882, No. 9.

Bassi (1), e la *pneumomicosi aspergillina* degli uccelli (2)). Sono note inoltre le esperienze di Grohe (3) e di Block (4), i quali, iniettando nel torrente circolatorio degli animali le spore di Aspergillo e di Penicillo, ottennero negli stessi lo sviluppo dei miceli. In seguito Grawitz, Koch (5), Löffler (6) e Lichtheim hanno confermato queste osservazioni, constatando la possibilità dello sviluppo negli animali anche di alcune specie di « *Mucor* ». È da notare però che in tutte queste esperienze si ebbe nell'organismo animale la vegetazione delle spore in filamenti, ma non la fruttificazione; sicchè cogli ifomiceti non si è finora ottenuta giammai una malattia trasmissibile direttamente da uno ad altro animale.

Finalmente un altro microrganismo patogeno, appartenente alla classe degli ifomiceti ma ad un'altra famiglia, a quella dei « Saccaromiceti », è il SACCAROMYCES ALBICANS (Tav. 1ª, fig. 4) il quale era prima descritto col nome di « Oidium albicans » e che invece, secondo le ricerche di Grawitz, sarebbe identico col *Mycoderma vini*. Questo fungo è la causa della malattia chiamata *Mughetto*, rappresentata da un deposito bianco, lassamente aderente alle parti sottostanti, che si manifesta non di rado nei bambini lattanti e nei malati denutriti, sulla mucosa della bocca, della retrobocca e dell'esofago, raramente nello stomaco e nell'intestino, e talora anche nella vagina delle donne gestanti e sul capezzolo delle nutrici. Questa patina bianca è composta da cellule epiteliali, da batteri e da filamenti e conidi del fungo caratteristico.

Questo si sviluppa facilmente nelle soluzioni di amido, di destrina, di zucchero, nella gelatina, nel latte di donna e nella saliva. Secondo Grawitz si sviluppa eziandio per mezzo dell'innesto sulle mucose degli animali.

---

(1) BASSI, Del mal del segno, calcinaccio o moscardino, Milano 1837.

(2) SCHÜTZ, *Ueber das Eindringen von Pilzsporen*, ecc. Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. II, p. 208.

(3) GROHE, Berl. klin. Wochenschr. No. 1, 1870.

(4) BLOCK, *Ueber Pilzbildung in thierischen Geweben*. Inaug.-Dissert. Stettin 1871.

(5) KOCH, Berl. klin. Wochenschr. No. 52, 1881.

(6) LÖFFLER, Mitth. a. d. kais. Ges. 1881.

E qui termina lo elenco dei principali microparassiti che son noti fino ad ora; è da sperare che fra non molto, cercando attivamente e perfezionando ancora i metodi di ricerca, si giunga a completarlo e si possa di ciascuna malattia infettiva designare il microbo patogeno caratteristico.

INDICE ALFABETICO

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I.

Fig. 1. — Microsporon furfur. *a*, lembo di epidermide con ammassi di spore e filamenti. — 400 diam. (dal Bizzozero).

» 2. — Achorion Schönleinii. *a* filamenti pallidi ramificati; *b* filamenti protoplasmatici; *c* conidi a coroncina; 2 *bis*. porzione intrafollicolare di capello sottile, contenente filamenti e spore. — 400 diam. (dal Bizzozero).

» 3. — Tricophyton tonsurans, tolto da un caso di erpete circinnato: *a* ammasso di lamelle cornee con filamenti del fungo. 400 diam. 3 *bis*. pelo spezzato, pieno di spore. Piccolo ingrandimento (dal Bizzozero).

» 4. — Oidium albicans. *a* estremità d'un filamento con un conidio terminale. 700 diam.; *b*, *c* filamenti con conidi terminali e laterali; *d* spore isolate con corpuscoli brillanti. 400 diam. (dal Bizzozero).

» 5. — Colonia di micrococci della risipola (*a*) nell' interno di un vaso linfatico (*b*), contenente qualche corpuscolo bianco (*d*). Sezione dell'orecchio d'un coniglio inoculato coi cocci specifici. 250 diam. (dal Ziegler).

» 6. — Bacillo piogeno fetido (Passet). Da una cultura in gelatina. 790 diam.

» 7. — Micrococco tetragono del Koch. Dal sangue di un topo bianco, inoculato col prodotto di una cultura netta del micrococco. 600 diam.

» 8. — Actinomyces bovis. Gli ammassi del fungo si vedono sezionati trasversalmente (da un tumore del mascellare di un bovino). 695 diam.

Tav. I

Fig. 1

Fig. 3

Fig. 3 bis

Fig. 2

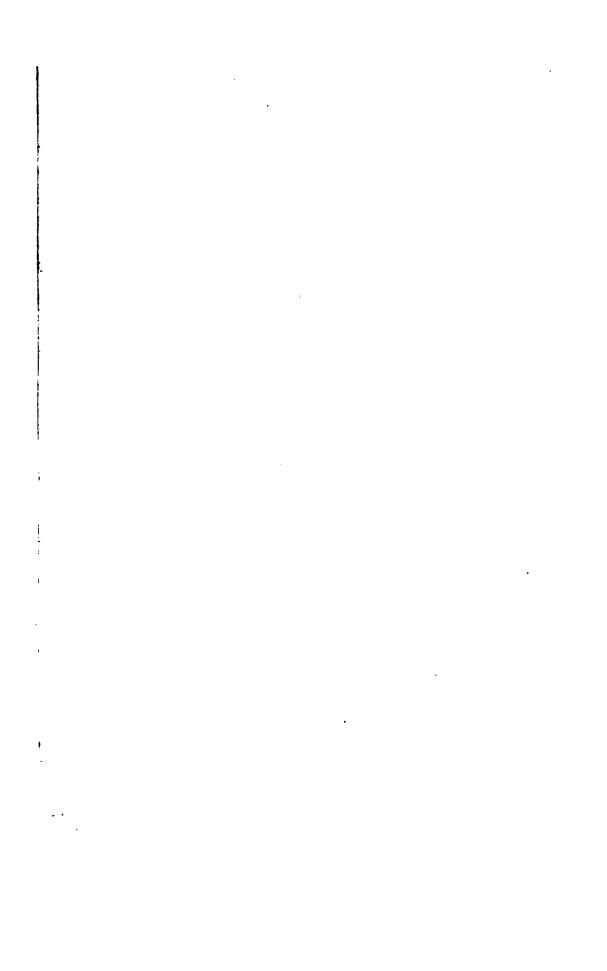
Fig. 2 bis

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 8

Fig. 7

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA II.

I disegni, tranne i primi due riprodotti dall'opera del Koch « Die Aetiologie der Tuberculose », sono tutti originali e tratti da' miei preparati.

FIG. I. — Bacilli tubercolari in un tubercolo del polmone. 700 diam.

» II. — Bacilli tubercolari entro una cellula gigante. 400 diam.

» III. — Bacilli della lebbra entro le cellule di un nodo lebbroso cutaneo. Zeiss $^1/_{12}''$, Oc. 3. 695 diam.

» IV. — Bacilli della lebbra isolati. Zeiss $^1/_{18}''$, Oc. 4. 1515 diam.

» V. — Vibrioni colerigeni. Da una cultura netta in gelatina. Zeiss $^1/_{12}''$, Oc. 5. 1265 diam.

» VI. — Supposti microbi del « Cholera nostros » di Finkler e Prior. Zeiss $^1/_{12}''$, Oc. 5. 1265 diam.

» VII. — Bacilli tifosi. Dall'interno di una placca di Peyer tumefatta, non ulcerata. Zeiss $^1/_{18}''$, Oc. 4. 1515 diam.

» VIII. — Pneumococci nel polmone. Alveolo con essudato fibrinoso. Zeiss $^1/_{12}''$, Oc. 3. 695 diam.

» IX. — Pneumococci con capsula. Essudato pleurico di cavia, due giorni dopo l'innesto. Zeiss $^1/_{12}''$, Oc. 4. 950 diam.

» X. — Bacilli carbonchiosi contenenti spore. (Colorazione doppia). Zeiss $^1/_{12}''$, Oc. 3. 695 diam.

» XI. — Bacilli carbonchiosi entro i vasi di un glomerulo renale. Sezione del rene di topo bianco carbonchioso (Colorazione doppia col picrocarmino e violetto di genziana). Zeiss *E*, Oc. 3. 490 diam.

» XII. — Gonococci entro le cellule del pus gonorroico. Zeiss $^1/_{12}''$, Oc. 4. 950 diam.

TAV. II

C. Pollonara cromolit.

Lit. F.lli Doyen Torino

Fig. 1
Fig. 2
Fig. 2 bis
Fig. 3
Fig. 3 bis
Fig. 4
Fig. 6
Fig. 7
Fig. 8